

FACULTAD DE CIENCIAS
GRADO EN BIOLOGÍA
TRABAJO FIN DE GRADO
CURSO ACADÉMICO [2017-2018]

TÍTULO:

**APTÁMEROS COMO ALTERNATIVA A LOS FÁRMACOS
BIOLÓGICOS.**

AUTOR:

Nerea Villaescusa García

Resumen

Los aptámeros son moléculas monocatenarias de ADN o a ARN que poseen alta capacidad para unirse a una amplia variedad de componentes diana, con una especial afinidad y especificidad comparable o mayor a otras biomoléculas. Esta propiedad les ha permitido destacar en gran medida en la industria biotecnológica, desarrollándose como herramientas útiles para el diagnóstico y aplicación terapéutica frente a multitud de enfermedades, entre las más relevantes el cáncer. Factores como el coste de producción, regularidades más simples al prescindir del uso de animales, o la poca inmunogenicidad que presentan al ser administrados, han conducido a la reflexión de que los aptámeros podrían rivalizar y reemplazar a los fármacos biológicos (anticuerpos monoclonales); figurando en varios estudios de la bibliografía que estos presentan igual o mayor eficacia respecto a afinidad y especificidad de unión que los mismos. Una ventaja accesoria es la facilidad con la que son combinados con conjugados, lo que facilita la descripción de nuevas variedades de metodología *SELEX* que tenderían a optimizar y mejorar la caracterización de los aptámeros para superar algunas de las limitaciones que ofrecen *in vivo* e *in vitro*, así como el desarrollo de otros nuevos en aplicación a otros campos. Es probable que en un futuro próximo la aplicación comercial de aptámeros encuentre cada vez más uso en el sector con el avance simultáneo de estas tecnologías; prueba de ello es el auge continuo en el número de estudios publicados en los últimos años, predecible a ser mayor de nuevo en los próximos años.

Palabras clave: “Aptámeros”, “ligandos”, “SELEX”, “inmunoterapia”, “biosensores”.

Summary

Aptamers are single-stranded DNA or RNA with a high ability to bind to a wide variety of targets, with a special affinity and specificity similar or better than other biomolecules. This property has allowed them being highlighted mostly in the biotechnology industry, developing as useful tools for diagnosis and therapeutic applications against many diseases, among the most significant cancer. Factors like production costs, easier application by dispense with use of animals, or the low immunogenicity they produce *in vivo*, have led to the thought that they could compete and replace biologic pharmaceuticals (monoclonal antibodies); as it has been shown in several studies, that they offer the same or more efficacy in relation to binding affinity and specificity. An additional advantage is the simplicity with they are combined to conjugates, which sustains the description of new varieties of *SELEX* methodology that

would optimize and improve characterization of aptamers to solve some limitations they offer *in vivo* and *in vitro*, as well as the development of other new ones in application to other fields. It is likely that in a near future the commercial application of aptamers will have an increased use in the sector with its simultaneous technology advance; proof of that is the increase in the number of studies published in recent years, hopefully to be greater again over the next years.

Key words: “Aptamers”, “ligands”, “SELEX”, “immunotherapy”, “biosensors”.

ÍNDICE

Contenido

Introducción	1
<i>Antecedentes sobre los aptámeros</i>	1
<i>Tecnología SELEX</i>	3
<i>Innovaciones de la técnica</i>	6
<i>Aplicaciones</i>	8
<i>Desarrollos en Biotecnología</i>	8
<i>Desarrollos en Biomedicina</i>	10
Resultados	14
<i>Diagnóstico</i>	14
<i>Terapia</i>	15
<i>En aplicación al cáncer</i>	15
<i>Biosensores</i>	19
<i>Desarrollo actual en la industria</i>	19
Discusiones	22
Conclusiones	26
Bibliografía	28
Anexos	37

Introducción

La constante renovación que está sufriendo hoy en día la industria biotecnológica respecto a la realización de nuevos estudios en el ámbito de la Biomedicina, ha supuesto en muchos casos el descubrimiento de nuevos métodos de diagnóstico o formas de terapia, aplicables a patologías como el cáncer. Recientemente en este ámbito han surgido aplicaciones como los aptámeros, de gran relevancia en los avances de la inmunoterapia, donde además mejoran la administración de algunos fármacos. A lo largo de los últimos años, se han aplicado principalmente para funcionar como biosensores (Liu *et al.*, 2009), agentes de diagnóstico (Hermann y Patel, 2000) o herramientas en proteómica como ensayos de purificación de proteínas (Kotia, Li y McGown, 2000); así como para terapias dirigidas frente a dianas concretas causantes de la etiopatogenia de multitud de enfermedades (Ulrich *et al.*, 2006). Pero además de todo ello, están relevándose a otros campos biomédicos como las neurociencias, destacando su desarrollo en las enfermedades neurodegenerativas (Bouvier y Ducongé, 2018) (ver Apéndice Anexos, Tabla 1).

Antecedentes sobre los aptámeros

Los aptámeros constituyen cadenas de ácido desoxirribonucleico (ADN) o ácido ribonucleico (ARN) de aproximadamente 100 nucleótidos, que poseen la capacidad de unirse a compuestos de interés con alta afinidad y especificidad. Poseen la propiedad de funcionar como ligandos, dadas las propiedades moleculares complejas y sofisticadas que presentan respecto al reconocimiento de moléculas pequeñas, estructuras multiméricas, y células (Li *et al.*, 2013) (ver Apéndice Anexos, Fig 1). Se identifican a partir de la combinación de librerías de oligonucleótidos por selección *in vitro* mediante la técnica de Evolución Sistemática de Ligandos por Enriquecimiento Exponencial (SELEX). Precisamente esta metodología fue descrita por quienes descubrieron por primera vez estas moléculas (Tuerk y Gold, 1990), en donde cadenas de ARN se unían específicamente a una proteína; estudiaron la especificidad de unión entre el ARN ribosómico y el mensajero codificante para la ADN polimerasa del bacteriófago T4 (gp43). Otro aporte fue el de un grupo de la Universidad de Colorado (EE.UU), que observaron que cadenas de ARN se unían de manera específica a colorantes orgánicos, como *Cibacon Blue* o *Reactive Blue 4*, utilizados como aditivos en plásticos, alimentos y bebidas (Ellington y Szostac, 1990). Estos los bautizarían bajo el nombre por el que hoy son conocidos: *aptámeros*, del latín *aptus*- (encajar) y *-meros* (parte).

Si bien el *SELEX* es fundamentalmente sintético, algunos aptámeros existen ya en la naturaleza funcionando como ligandos de ARN; son los llamados *riboswitches*. Se tratan de secuencias codificantes en la posición 5'UTR, precedente al codón AUG de inicio de la traducción del ARNm en el dominio Bacteria. Afectan directamente a la expresión de los genes codificados en el mismo (elementos en *cis*), mediante la formación de estructuras alternativas en respuesta a la unión de un ligando. En eucariotas, se ha descubierto que en algunos casos el *riboswitch* Tiamina pirofosfato (TPP) podría regular el proceso de *splicing* en el extremo 3' (Wachter *et al.*, 2007).

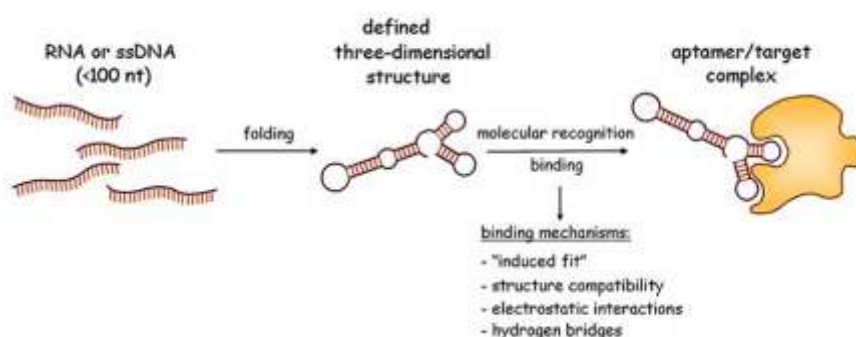


Fig 1. Esquema del concepto de aptámero. Las cadenas de ácido nucleico al estar constituidas por nucleótidos forman entre sus bases puentes de hidrógeno, atribuyéndole a la cadena formas peculiares (asas, tallos, protuberancias o ganchos), y constituyendo así una estructura tridimensional única determinante de la unión al analito, así como la fuerza y especificidad de la misma. (Regina Stoltenburg, UFZ; citado en Reinemann y Strehlitz, 2014, p.2).

Entre las primeras publicaciones sobre el desarrollo de aptámeros terapéuticos, destacó el aptámero 2'-NH₂ anti-VEGF modificado (Green *et al.*, 1995), el primero de muchos otros específicos del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), que posteriormente conducirían al desarrollo de Macugen, el primer aptámero terapéutico aprobado clínicamente para el tratamiento de la Degeneración macular asociada a la edad (Lato, Boles y Ellington, 1995). Desde las primeras investigaciones sobre los aptámeros, se han desarrollado multitud de innovaciones en su obtención y caracterización *in vitro*; y pese a ello, desde el Macugen, ningún aptámero ha conseguido su aprobación en los 10 últimos años, pero muchos de ellos se encuentran en etapas avanzadas de ensayos clínicos. La finalidad es llegar al estadio del proceso en el que se avance desde ensayos de prueba de concepto hacia aplicaciones clínicas rutinarias; y de hecho un primer paso

fue llevado a cabo con la puesta en el mercado de estos ensayos diagnóstico en formato kit listo para usar por empresas de la tecnología (Müller *et al.*, 2011, 2012). Algunas empresas muy activas en este campo son Archemix Inc., USA (<http://www.archemix.com>), Noxxon Pharma AG, Germany (<http://www.noxxon.net>), Isis Innovation Ltd., UK (<http://www.isis-innovation.com>), y SomaLogic Inc., USA (<http://www.somallogic.com>). La aprobación del *Pegaptanib* para el tratamiento de la Degeneración macular asociada con la edad por la *U.S. Food and Drug Administration* (FDA), es probablemente el desarrollo más significativo hasta la fecha.

Un caso relevante han sido recientemente los aptámeros antiproliferativos AS1411 y NOX-A12, que han completado los ensayos de fase III y están siendo evaluados como aplicación al tratamiento de la Leucemia Mieloide Aguda (Poolsup y Kim, 2017).

Tecnología SELEX

El desarrollo de aptámeros ha sido posible en gran medida gracias a la invención de esta metodología mediante la cual se obtienen, descrita por primera vez en 1990. El proceso consiste en perfeccionar y aislar ligandos específicos de sistemas naturales, por el uso de librerías de oligonucleótidos producidos por síntesis química. Estos fragmentos de ácidos nucleicos sufren una gran variedad, de en torno 10^{15} combinaciones posibles, que junto a las fases de amplificación que tienen lugar durante el proceso de selección, aumentan aún más las probabilidades que presenten alta afinidad frente a la diana de interés. Cabe añadir que este método se realiza en condiciones similares a las que posteriormente se utilizan en los ensayos de función, es decir, aquellos para los que se está diseñando el aptámero y en los que se pone a prueba su eficacia de unión a su diana; de esta forma se asegura que permanezca estable su estructura y no tienda a disociarse (Mukhopadhyay, 2005).

Los primeros aptámeros desarrollados eran de ARN sin modificar; tan sólo dos años después fue cuando se utilizó con secuencias monocatenarias de ADN (Ellington y Szostac, 1992), que mostraron la misma eficacia de reconocimiento y unión al ligando que sus predecesores. A partir de entonces fue cuando el *SELEX* se convirtió en una herramienta ampliamente utilizada, siendo adicionalmente modificada para diferentes aplicaciones.

En el inicio del proceso se parte de una librería de oligonucleótidos aleatorios o secuencias *random* de ADN (ssDNA), en donde cada fragmento comprende una región random central (20-80 nucleótidos) flanqueada por secuencias específicas de 18-21

nucleótidos, que funcionan como sitios de unión de *primers* en los extremos 5' y 3' para la amplificación que tiene lugar en cada ronda del *DNA SELEX*. Este pool es incubado con la molécula diana a unirse e interactúan por selección positiva. Los complejos de unión formados son separados de aquellos oligonucleótidos que no se han unido o mostraban uniones demasiado débiles a la diana, y son eluidos y amplificados por la técnica de Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El resultante bicatenario se incorpora a un nuevo pool de estas moléculas separando la cadena de ADN relevante, o transcribiéndose *in vitro* a ARN y se purifica. Este pool rico en oligonucleótidos potenciales será usado en otra reacción de unión frente a la diana en la siguiente fase del proceso. Será mediante estos ciclos interactivos de selección y amplificación enzimática, que el pool con el que se comenzó el proceso es reducido a unos pocos motivos, que poseen la especificidad y afinidad más alta para la diana en cuestión. La última ronda es interrumpida tras la fase de amplificación, donde los productos de la PCR son clonados para realizar un *screening* de cada aptámero seleccionado, además de ser secuenciados y analizados. Finalmente, la mayoría se ven sujetos a cambios *post-SELEX*, incorporándoles nucleótidos modificados para la mejora de su estabilidad (Rhodes *et al.*, 2000), o con la finalidad de purificar moléculas se asocian a grupos testigo (Sekiya *et al.*, 2006).

En el caso de querer seleccionar aptámeros de ARN (*RNA SELEX*) el procedimiento difiere algo del anterior. La librería de oligonucleótidos de ssDNA es transformada mediante PCR a fragmentos de dsDNA previamente a la primera fase de comenzar el *SELEX*. En este caso, se emplea un *primer forward* especial que contiene el promotor del fago T7 en el extremo 5' (además del *reverse*). Posteriormente el bicatenario resultante es transcrito *in vitro* por la ARN polimerasa del fago T7, dando lugar a una librería de ARN aleatoria. En cada ronda del proceso, el ARN seleccionado debe de sufrir transcripción reversa y amplificación por RT-PCR usando el mismo *primer* utilizado en la transcripción inicial a partir de la librería de ssDNA, y dando como resultado ADN cíclico (cDNA bicatenario). Este pool para la siguiente ronda habría de ser transformado nuevamente mediante transcripción *in vitro*.

Los aptámeros de ARN por lo general tienen la capacidad de unirse a la diana con más afinidad y especificidad que los de ADN, debido al grupo adicional hidroxilo que presentan y que promovería interacciones moleculares más fuertes (Amraee *et al.*, 2017). Sin embargo, cabe añadir que su producción es más costosa y compleja que los otros de acuerdo a las modificaciones posteriores necesarias para la mejora de su estabilidad.

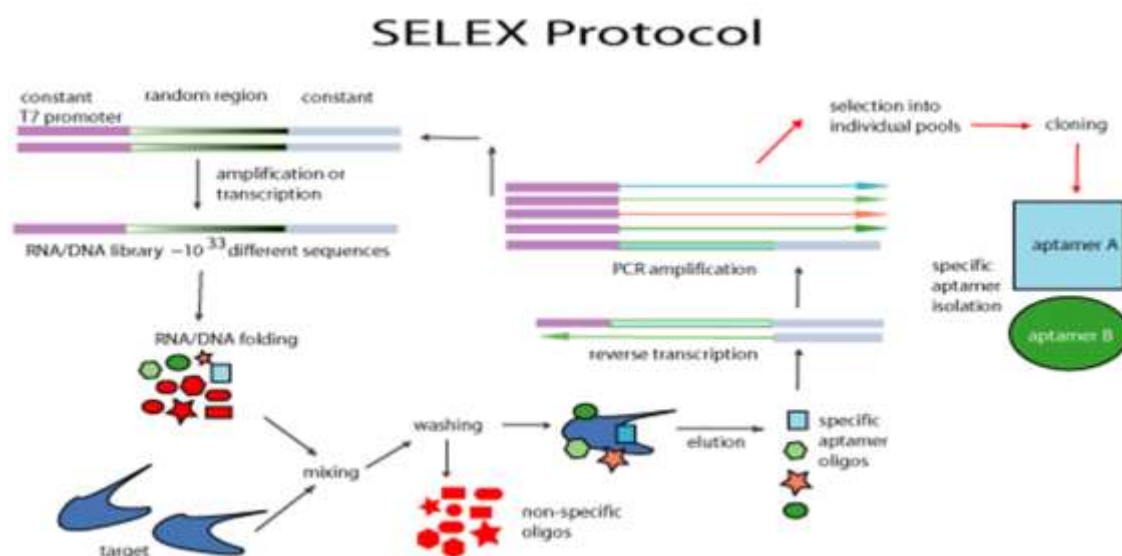


Fig 2. Diagrama de flujo del procedimiento *SELEX* para generar aptámeros de ARN. Partiendo de fragmentos dsDNA, por transcripción con la polimerasa T7 se obtiene ssRNA, que interacciona con la diana en la fase de unión. Posterior a una fase de lavado, se eluye separando el complejo de unión que conformaba con la diana, y sufre transcripción reversa por RT-PCR. Luego se someten a un *screening* y son clonados para producción. El proceso es el mismo para los de ADN, salvo se parte de ssDNA directamente o se seleccionan por PCR a partir del bicatenario, y posterior a la elución también sufren una fase de amplificación (PCR) (Gene Link TM, n.d.).

Se ha descrito que distintos ligandos presentan distintos niveles de probabilidad para ser reconocidos por aptámeros, reflejado en la afinidad que muestran estos por sus ligandos. Características que contribuyen a facilitar este reconocimiento son la planaridad (nucleótidos o nucleobases e.g compuestos aromáticos), la presencia de enlaces de hidrógeno donadores y aceptores, o grupos cargados positivamente como las aminas primarias que presentan los aminoglucósidos (antibióticos) (Wilson y Szostak, 1999; Rimmele, 2003). Todo ello viene representado por los principios básicos de la interacción intermolecular, donde se unen por complementariedad en forma, interacciones entre compuestos aromáticos y sus nucleobases, interacciones electrostáticas entre grupos cargados o enlaces de hidrógeno (Patel, 1997a; Patel *et al.*, 1997b; Hermann y Patel, 2000). Los elementos más complicados a reconocer son aquellos que no presentan planaridad y a su vez son neutros o presentan carga negativa, o poseen carácter altamente hidrofóbico (Wilson y Szostak, 1999). Otro aspecto apreciable es que cuanto más diversidad presentara la librería de oligonucleótidos al inicio, mayor sería la afinidad por

la molécula en cuestión (Amraee *et al.*, 2017). En este caso se utilizaron 117pb de nucleótidos en una librería más amplia en comparación a otros estudios, para seleccionar aptámeros frente a *E.coli* O157. El resultado mostró una mejora en la especificidad y sensibilidad del aptámero AM-6 en comparación con otros para *E.coli* en la literatura.

Innovaciones de la técnica

Como se ha dicho, se usan en conjunción con una gran variedad de moléculas diana; desde moléculas pequeñas como colorantes o iones, hasta ácidos nucleicos y proteínas, las cuales fueron utilizadas como diana en el primer protocolo original del proceso (Famulok, Mayer y Blind, 2000). Las últimas dianas incorporadas a la lista han sido virus, organismos enteros como *Drosophila* B52 e incluso células vivas (Famulok, Blind y Mayer, 2001) (ver Apéndice Anexos, Fig 2).

La metodología *SELEX* ha sido ampliamente modificada para adaptarse a la multitud de aplicaciones que ofrecen los aptámeros, y con el objetivo de mejorar la afinidad, especificidad u optimizar dicho procedimiento (Tabla 1).

Tabla 1. Algunas variedades de metodología *SELEX* descritas en la literatura.

Variante	Descripción	Referencia
<i>Negative SELEX</i>	Es el más simple. No se especifica la especificidad contra la matriz de selección al incubar la biblioteca del nucleótidos con esta, de forma que los aptámeros no específicos no evolucionan. Útil en el uso de proteínas como diana.	Tuerk y Gold, (1990); Ellington y Szostak, (1990, 1992)
<i>In vivo SELEX</i>	Los aptámeros seleccionados son capaces de localizar específicamente la diana dentro de la célula viva.	Coulter, Landree y Cooper, (1997)
<i>Chimeric SELEX</i>	A partir de una biblioteca de aptámeros fusionados. Los resultantes se unen a dos objetivos diferentes y totalmente independientes.	Burke y Willis, (1998)
<i>Cell-SELEX</i>	Células enteras vivas son utilizadas para generar aptámeros contra proteínas de superficie celular y otras macromoléculas. No necesita ningún conocimiento previo de la diana, lo que permite el descubrimiento de nuevos biomarcadores.	Homann y Goring, (1999)
<i>Surface Plasmon Resonance (SPR SELEX)</i>	La diana se inmoviliza en un chip SPR y se incorpora la biblioteca; permite la monitorización de la cinética de unión produciendo un aptámero de alta afinidad.	Khatri <i>et al.</i> (2003)
<i>MonoLEX</i>	Selección en un solo paso basada en el fraccionamiento de columna y pirosecuenciación.	Nitsche <i>et al.</i> (2007)
<i>Microfluidic SELEX</i>	Requiere menos tiempo y volumen de muestra que el SELEX convencional. Se basa en un dispositivo automático, con la combinación de perlas magnéticas y sistema de transporte microfluídico.	Huang <i>et al.</i> (2010)
<i>Particle Display SELEX</i>	Aprovecha la emulsión del agua en aceite. Cada gota de emulsión contiene un aptámero, unidos respectivamente a su diana son separados por citometría.	Wang <i>et al.</i> (2014)
<i>Genetic alphabet Expansion for SELEX (ExSELEX)</i>	Introduce bases sintéticas para aumentar la diversidad estructural y funcional de los aptámeros, reflejándose en una mejora de la afinidad; combinado con la incorporación de una mini horquilla estable de ADN, que protegerá contra nucleasas o desnaturalización térmica.	Hirao, Kimoto y Lee, (2018)

Aplicaciones

Los aptámeros han surgido de forma destacable como agentes de reconocimiento molecular, adquiriendo una diversa funcionalidad en diagnóstico y terapia, y ejerciendo de sensores para la detección de elementos (ver Apéndice Anexos, Fig 3). Son potenciales a ser utilizados en combinación con inmunoensayos, citometría de flujo, generación de imágenes, y estudios para el tratamiento de la Esclerosis múltiple (Nastasijevic *et al.*, 2012). Al ser producidos por síntesis química, ofrecen ventajas significativas en términos de coste en producción, aprobaciones regulatorias más sencillas, y menor inmunogenicidad cuando se administran en dosis preclínicas 1000 veces mayores que las utilizadas para la aplicación terapéutica animal y humana (Germer, Leonard y Zhang, 2013).

Desarrollos en Biotecnología

Uno de los campos relevantes en donde comenzaron a introducirse fueron las plataformas de biosensores, en donde las basadas en aptámeros (aptasensores) tendrían el potencial de superar algunos de los inconvenientes de otros biosensores tradicionales basados principalmente en anticuerpos. Algunos aptasensores han sido desarrollados para la detección de microorganismos, después de la selección con agentes purificados o células completas (Chang, Donovan y Tan, 2013). Un trabajo reciente ha empleado dos aptámeros, Antibac1 y Antibac2, como elementos de reconocimiento biológico en el diagnóstico de la sepsis (Graziani *et al.*, 2017); presentando alta afinidad a los importantes patógenos *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. Otros elaboraron un sensor basado en una película fina de nanoporos para detectar teofilina en extractos de planta y muestras de suero (Feng *et al.*, 2018). También se han aplicado para la detección de contaminantes ambientales; como es el caso de la Universidad de Illinois y Waterloo, que elaboraron kits de prueba basado en estos sensores colorimétricos para la detección de analitos en muestras acuosas (Lu y Liu, 2013).

En investigación básica, tal y como demuestran diversos estudios, pueden utilizarse en ensayos tan conocidos como la inmunofluorescencia, *microarrays*, inmunocitoquímica, inmunohistoquímica, citometría de flujo, el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), o ensayos de transferencia (Groff, Brown y Clippinger, 2015). Es tal la especificidad que presentan, que pueden distinguir entre moléculas quirales, reconocer un epítipo distinto de una molécula diana, o diferenciar componentes estrechamente

relacionados con la teofilina y la cafeína (Jenison *et al.*, 1994), lo que los hace muy eficaces en reproductibilidad para este sector.

Su incorporación a otras técnicas, también ha permitido el surgimiento de nuevas herramientas prometedoras para el bioanálisis. Una de ellas es la asociación con nanomateriales, partículas de un rango de tamaño comprendido entre 1-100 nm, que cabrían mejorar las propiedades de detección en estas plataformas. Las nanopartículas magnéticas (MNPs) combinadas con aptámeros permiten la separación y enriquecimiento células específicas de grandes poblaciones; tal y como hizo Herr *et al* (2006) para detectar y obtener células leucémicas de la sangre (Herr *et al.*, 2006). También en este aspecto, pueden funcionar para detección de células tumorales funcionando como “interruptores” de relajación magnética (MRSw) en modo de interacción molecular, ya que al unirse a la diana forman “clusters” disminuyendo el tiempo de relajación spin-spin (AT2) de los protones del agua circundantes (Yu-Lin *et al.*, 2017); mide esa diferencia ya que las muestras biológicas no presentan un fondo magnético, sin la necesidad de un sistema de detección óptico.

Otras han sido las nanopartículas de oro (AuNPs), que debido a su superficie y tamaño variable, sirven como andamios de ligandos; en este caso muy útiles para la detectar proteínas de superficie realmente escasas en estadios tempranos como el del cáncer (Jiang *et al.*, 2017). También se han asociado a propiedades de quimioluminiscencia; Qi *et al* (2011) se basó en la aglomeración de estas partículas cuando sucedía la interacción, de forma que mejoraba la actividad catalítica en la reacción quimioluminiscente del luminol con el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en presencia de sales. Este biosensor mostró un límite de detección, en este caso para trombina, de 4 órdenes de magnitud menores que otros métodos colorimétricos basados en las mismas partículas (Qi y Li, 2011).

Otras metodologías aparte de los nanomateriales, han sido los dispositivos microfluídicos para obtener células de suspensiones presentes en poca concentración, por inmovilización en capilares conectados a jeringas. En un estudio en el que se emplearon capilares cuadrados, la eficiencia de captura mejoró un 33% puesto que al ser la sección transversal más alta, disminúa la velocidad de flujo de las células (Martin *et al.*, 2011), en comparación a los usuales de forma circular. Otros se han elaborado con “cocktails” de aptámeros en modo de seleccionar sinérgicamente líneas celulares circulantes de tumor (CTCs), dada la heterogeneidad que presentan *in situ* en el paciente en comparación a los cultivos en placa (Zhao *et al.*, 2016).

Desarrollos en Biomedicina

Muchas de las plataformas desarrolladas en Biotecnología de las comentadas anteriormente son aplicadas para estudios en investigación básica, pero adquieren aun más un papel relevante para el diagnóstico en el ámbito de la biosanidad. Ayudan no sólo a reducir la tasa de errores en diagnóstico, sino a comprobar también la eficacia de determinados medicamentos. No requieren de ningún pretratamiento de la muestra o kit especial, requieren menor cantidad de muestra por ejemplo en células comparado a la citometría de flujo; y permiten una actuación rápida de las identidades sanitarias al requerir menos tiempo y ofrecer información previa en algunos casos muy oportuna de los pacientes.

Se han reportado varios métodos de detección en el Cáncer de próstata en hombres para el antígeno prostático específico (PSA) (Acevedo *et al.*, 2002), como el ELISA, el radioinmunoanálisis, el inmunoensayo quimioluminiscente, y los inmunosensores; todos ellos basados en anticuerpos debido a su alta selectividad hacia el antígeno. Recientemente se ha demostrado un aptámero híbrido con polímeros sintéticos (*Molecularly imprinted polymers*, MIP) de ser altamente sensible a la detección electroquímica de PSA (Jolly *et al.*, 2016).

Otro ejemplo es el caso del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), cuyo diagnóstico inicial también se basa en inmunoensayos, principalmente el ELISA, que detecta la presencia de anticuerpos del Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH-1 y VIH-2), y la infección del VIH-1 por presencia del antígeno p24. Varios aptámeros específicos del VIH-1 así como de proteínas huéspedes que interaccionan con el virus se han diseñado para presentar finalidades como la neutralización de los viriones o sus proteínas (Zhao *et al.*, 2014), además de para la detección de la proteína Tat del VIH-1 (Tombelli *et al.*, 2005) y Rev; usando métodos basados en Resonancia en superficie de plasmones (SPR), Microbalanza de cristal de cuarzo (QCM) y la técnica del Transistor de efecto campo (FET) (Schlecht *et al.*, 2007).

Además de los biosensores, los aptámeros principalmente en este campo están destacando en modo creciente como nuevas formas de terapia. Son ideales en aspectos como la generación de imágenes, incluyendo monitorización del tratamiento en asociación con la aplicación de determinados fármacos y detección de enfermedades como el cáncer, donde se han detectado células tumorales a niveles mínimos (Pei, Zhang y Liu, 2014). Precisamente comenzaron a introducirse en Biomedicina en este contexto, para descubrir marcadores tumorales que incluyen la glicoproteína mucina 1 (MUC-1),

el antígeno de membrana específico de próstata (PSMA), el receptor 3 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER3), la Tentascina-c, y otros receptores (Khedri *et al.*, 2015).

Dada la especificidad que presentan frente a componentes celulares y que son capaces de diferenciar receptores de células tumorales de los que no lo son (Chang, Donovan y Tan, 2013), se han combinado de forma covalente y no covalente con agentes terapéuticos, mejorando la eficacia de entrega de algunos fármacos y reduciendo los efectos secundarios asociados consecutivamente. Existen varios ejemplos, como la asociación no covalente a Doxorrubicina (Dox) como agente quimioterapéutico utilizado en el tratamiento de diversos cánceres, que han demostrado una eficacia terapéutica mejorada en comparación a la aplicación única de Dox (Sun *et al.*, 2014). También se han evaluado como alternativa a los anticuerpos conjugados con fármacos (ADCs) en tratamiento al Adenocarcinoma ductal pancreático (Kratschmer y Levy, 2018). Tal es la eficacia por ir dirigidos a células tumorales como por ser desencadenantes de células efectoras inmunitarias; que son considerados a ser candidatos para formulaciones de vacunas frente a tumores e inmunoterapia frente al cáncer (Khedri *et al.*, 2015).

En este mismo aspecto, también se han combinado con nanomateriales, para aumentar la vida media y la capacidad de carga de drogas en la entrega de fármacos. Por determinadas propiedades físico-químicas ofrecen ventajas, como es el caso de los copolímeros y liposomas que son biodegradables, o ciertos materiales metálicos que ofrecen fototermicidad y propiedades metálicas peculiares (Sun *et al.*, 2014).

Han mejorado notablemente la terapia génica con respecto a ARNs de interferencia (siRNA) y microARNs (miRNA) como herramientas de silenciamiento de genes, cuya aplicación ha estado restringida debido a la falta de especificidad celular / tisular que presentan en su administración *in vivo*. Ambos componentes se conjugan covalentemente para formar quimeras. Un estudio elaboró un aptámero modificado de ARN (A10) específico del PSMA, conjugado con un siRNA para una quinasa tipo polo 1 (Plk1) o para células B de linfoma 2 (Bcl2), que inhibía *in vivo* el crecimiento del tumor (McNamara *et al.*, 2006).

En la Inmunoterapia, una especialidad que está adquiriendo mucha importancia en el diseño de nuevos tratamientos frente al cáncer; también están surgiendo en modo de funcionar en forma semejante a como lo han hecho los anticuerpos. Prueba de ello fue un estudio llevado a cabo por Stecker *et al* (2012), en donde la combinación del aptámero MUC1 con la molécula del complemento C1q por biotina-streptavidina inducía la

formación del complejo de ataque a la membrana (MAC) y consecutivamente lisis celular en la línea MCF7 de cáncer de mama (Stecker *et al.*, 2012).

Por sí mismos también constituyen la denominada Bioterapia, en donde al interaccionar con determinados componentes celulares, intervienen y alteran sus funciones biológicas normales; bien confiriendo efectos agonísticos o antagonísticos, que al final termina con la muerte de la célula tumoral. Un ejemplo es el papel antagonista que protagonizan frente a los Receptores tirosina quinasa (RTKs) de células tumorales, uniéndose al mismo receptor o a su ligando; demostrando en algunos casos superar algunas de las limitaciones apreciables en los Inhibidores de tirosina quinasa (TKIs) y en los anticuerpos monoclonales (Camorani *et al.*, 2018).

Objetivos

El objetivo principal de este estudio es determinar el potencial de los aptámeros como fármacos capaces de sustituir a los fármacos biológicos, más concretamente los más famosos anticuerpos monoclonales. Con la breve introducción ofrecida sobre los antecedentes de su caracterización molecular y rasgos potenciales a su aplicación en el ámbito biosanitario, como objetivo secundario se establece una búsqueda de bibliografía sobre estudios de desarrollo de aptámeros, representativos para adquirir la misma funcionalidad que los anticuerpos en su aplicabilidad, además de un análisis estadístico del número de publicaciones en modo de comprobar su dinámica de estudio en el sector. Para concluir, se mostrarán los posibles contrastes de los resultados obtenidos, y una breve explicación si la hay de los mismos.

Materiales y métodos

La información sobre antecedentes, producción y cada una de las funcionalidades que ofrecen los aptámeros, se extrajeron en base a estudios publicados en las distintas bases de datos Science direct, Scopus, y Pubmed. Como filtros de búsqueda se emplearon términos como “aptamer”, “SELEX”, “aptamer and cancer”, “biosensors”, etc, por título; restringiendo al formato Artículos de revista y tratando de seleccionar artículos con mayor impacto en citas, y de referencia actual respecto al año de publicación. Dada la masiva cantidad de información a procesar, el apartado inicial del trabajo se divide en una breve descripción del concepto básico de aptámero además de un contexto actual respecto a la industria biotecnológica y la metodología *SELEX*, seguido de una clasificación por aplicación en base a dos industrias: la Biotecnológica, que incluiría biosensores y técnicas en investigación básica; y la Biomédica, como herramientas de diagnóstico y terapia.

Además, gran parte de esta bibliografía serviría para documentar los resultados oportunos figurados en el mismo apartado, consistiendo en estudios desarrollo de aptámeros que representen en reproductibilidad y eficacia la misma aplicabilidad en experimentos que los anticuerpos monoclonales, e incluso que superen a los mismos.

Para nuestro segundo objetivo, el análisis de su dinámica de desarrollo en el contexto de la industria, se establecieron dos vías. Por un lado, las publicaciones anuales de ambos agentes, anticuerpos y aptámeros, desde el año 1994 (cuando surgieron por primera vez los aptámeros) hasta el año más reciente 2017, sin contar el actual 2018. En este caso, las publicaciones se obtuvieron de las bases de datos Science direct y Scopus, con los filtros *Research articles* y *Article*, con los términos de búsqueda por título (“aptamer”, “monoclonal antibody”), y extrayéndose a la vez que incorporándose por año de publicación a la plataforma Refworks, para descartar duplicados semejantes. Después, los resultados se trasladaron a Excel, para la elaboración de los gráficos. Cabe añadir que en la selección del número de artículos en filtro “monoclonal antibody” resultó suficiente, dada la enorme cantidad de datos obtenidos en la búsqueda respecto a ambas bases.

Por otro lado, para contrastar el número total de publicaciones aditivas en el contexto biomédico respecto a los anticuerpos, se realizó el contraste ANOVA para el análisis de homogeneidad de varianzas. Se obtuvieron los datos tan sólo de la base de datos Pubmed, con los términos “aptamer” y “monoclonal antibody”, de acuerdo a los filtros *Classical article* y *Journal Article*. Se incorporaron a un documento Excel el número de publicaciones por año con respecto a cada agente, figurando como réplicas con respecto a una variable. Finalmente se procesan los datos en el programa estadístico IBM SPSS Statistics, en donde nos da como resultado un p-valor para fijar nuestro umbral de confianza con respecto a nuestra hipótesis, además de generar un gráfico boxplot representativo.

En lo que respecta al apartado Anexos, todas las figuras y tablas a su vez fueron extraídas de la bibliografía consultada, en lo que señala su correspondiente referencia. Los datos que figuran en la Tabla 2 de este apartado sin embargo, fueron obtenidos de la consulta de las bases ClinicalTrials.gov (*U.S National Library of Medicine*) y EudraCT.

ACTIVIDAD	ENERO				FEBRERO				MARZO				ABRIL				MAYO			
	SEM1	SEM2	SEM3	SEM4	SEM1	SEM2	SEM3	SEM4	SEM1	SEM2	SEM3	SEM4	SEM1	SEM2	SEM3	SEM4	SEM1	SEM2	SEM3	SEM4
Reflexión y planteamiento de la idea																				
Consulta con el tutor académico. Descripción clara y precisa de lo que se va a abordar en el trabajo																				
Planificación de la memoria (apartados y subapartados) y enfoque de contenido																				
Búsqueda bibliográfica en las bases de datos Science direct y Scopus																				
Lectura y análisis de la información. Clasificación para apartados y subapartados																				
Redacción de la Introducción																				
Reserva de imágenes y elaboración de tablas																				
Objetivos																				
Búsqueda bibliográfica en Pubmed																				
Redacción de resultados y elaboración de tablas																				
Análisis de publicaciones y contraste ANOVA en SPSS																				
Apartado materiales y métodos																				
Discusión de resultados																				
Bibliografía																				
Tablas en apartado Anexos. Búsqueda en ClinicalTrials.gov y EudraCT																				
Portada e índice. Resumen																				
Revisión de la bibliografía																				

Tabla 2. Cronograma para establecimiento en modo organizado de las distintas actividades llevadas a cabo en la realización del trabajo. Se tuvo en cuenta para la temporalidad de un mes un total 4 semanas, compuestas cada una por 7 días, para un total de 5 meses. No incluyen la realización de la presentación ni preparación para la defensa oral, tan solo en lo que concierne a la realización del manuscrito.

Resultados

A partir de la comercialización del Macugen, se han ido desarrollando más tarde aptámeros contra proteínas de coagulación de la sangre, proteínas en relación con el cáncer, autoanticuerpos implicados en trastornos autoinmunes, diabetes, etc; en la literatura podemos encontrar una gran cantidad de aptámeros específicos contra una amplia variedad de dianas.

Diagnóstico

Han sido ampliamente seleccionados como agentes antivirales para la detección, prevención, eliminación de la hepatitis viral y otros agentes patógenos (Mescalchin y Restle, 2011). En este caso, la detección de virus con diversos protocolos de inmunoensayo parece ser preferible para el cribado de un gran número de muestras (Takahashi *et al.*, 2005). Para el caso del Virus de la madera estriada del manzano (ASPV) de la familia Betaflexiviridae, los anticuerpos monoclonales y el protocolo ELISA han sido también definidos (Gugerli y Ramel, 2004). Respecto a los aptámeros como tratamiento frente a la hepatitis viral, al igual que los anticuerpos, podrían dirigirse como posibles herramientas prometedoras contra cualquier proteína en las células

infectadas y cualquier componente de partículas virales (Wandtke, Wozniak y Kopinski, 2015; Ni *et al.*, 2011).

Tabla 3. Aptámeros aplicables a diagnóstico

Aptámero	Descripción	Referencia
MT32	Detección del virus ASPV mediante ELONA. Mostró suficientes resultados como para ser considerado una buena alternativa a los anticuerpos monoclonales.	Komorowska, Hasiów-jaroszewska y Minicka, (2017)
H01	Detección de infección por el virus de la Hepatitis B (HBV); alcanzó un límite de detección cinco veces menor que el método rutinario por ELISA.	Xi <i>et al.</i> (2015)

Terapia

En el tratamiento frente a la Esclerosis múltiple, ningún agente terapéutico basado en aptámeros ha recibido aprobación de la FDA. Recientemente, se ha desarrollado un anticuerpo monoclonal recombinante, rHIgM22 (Isotipo IgM humano reactivo frente a Sistema nervioso central (SNC)), que podría tener el potencial de convertirse en el primero en cuestión como agente terapéutico regenerativo en la Esclerosis múltiple. Sin embargo, un aptámero, el Myaptavin-3064, ha demostrado ofrecer la mismas propiedades que el anticuerpo en lo que concierne a atravesar la barrera hematoencefálica, acumularse en los sitios de lesiones desmielinizadas y producir remielinización en el modelo murino de Encefalitis por el virus Theiler (TEMV) (Nastasijevic *et al.*, 2012); con que el desarrollo continuo de este aptámero podría suponer otro agente prometedor para este caso. Como este estudio, otros representativos de la bibliografía figuran en la Tabla 2, más enfocados para ser desarrollados como tratamiento frente al cáncer.

En aplicación al cáncer

En este campo, existen ejemplos prometedores de que la inmunoterapia basada en aptámeros puede reemplazar la basada en anticuerpos monoclonales. Uno de ellos son aptámeros frente a 4-1BB, un miembro de la familia de receptores para el factor de necrosis tumoral (TNF). En efecto, anticuerpos agonistas frente a este receptor que fueron administrados en ratones, mejoraron la inmunidad y el rechazo al tumor dado que prolongan la supervivencia y expansión de los linfocitos T CD8⁺ (Melero *et al.*, 1997; May *et al.*, 2002). Los aptámeros son una opción atractiva debido a que la administración

de estos anticuerpos anti-4-1BB podría causar en algunos casos inmunogenicidad y problemas en ensayos clínicos. Otro receptor coestimulador inducible de la misma familia que el anterior es el OX40. Ambos aptámeros específicos de 4-1BB y OX40 como agonistas podrían convertirse en una nueva clase de efectores terapéuticamente muy relevantes.

Los linfocitos T del sistema inmunitario que se infiltran en los tejidos en donde hay presencia de tumores, sufren un estado progresivo de disfunción, mediada por múltiples receptores inhibidores presentes en estas células (Speiser *et al.*, 2014). La proteína 1 de muerte celular programada (PD-1) es el receptor inhibidor principal en las etapas iniciales del proceso; de forma que se bloquea a este nivel su función con anticuerpos revirtiendo el proceso, produciendo inmunidad antitumoral (Wherry *et al.*, 2007); pero además intervienen otros receptores adicionales, como TIM-3 o LAG-3 (Woo *et al.*, 2012). Cabe añadir sin embargo, que anticuerpos frente a otro regulador negativo, el antígeno 4 de linfocitos T citotóxicos (CTLA-4), aprobados por la FDA (*Ipilumimab*) (Weber, 2007), así como otros frente a 4-1BB, PD-1 o su ligando PD-L1; aunque estimulaban inmunidad protectora en pacientes humanos, su administración sistemática ha sido asociada con patologías autoinmunes que limitan su dosis, reflejando también la activación de células T autorreactivas residentes (Wheeler *et al.*, 2013).

Otros aptámeros destacables son aquellos específicos para el receptor CD28, el principal coestimulador de células T. Es expresado constitutivamente en la superficie celular, mientras que la expresión de CTLA-4 es inducida entre 24-48 horas posteriores a la activación (Driessens, Kline y Gajewski, 2009). Esta señal de coestimulación es la más fuerte llevada a cabo por las células presentadoras de antígeno (APCs) para promover la activación de linfocitos T, su proliferación y la secreción de interleucina 2 (IL-2), y en definitiva actividad antitumoral (Pastor *et al.*, 2013). En contraste, en 2006 se elaboró un estudio clínico en fase I para anticuerpos agonistas de CD-28 (TGN1412) en seis individuos humanos. Administrando una dosis 500 veces más pequeña que la fiable alcanzada en estudios animales, los seis individuos presentaron condiciones graves como fallo multiorgánico, y fueron introducidos en la unidad de cuidados intensivos, lo que llevó a la suspensión del ensayo en esta etapa (Suntharalingam *et al.*, 2006).

Respecto a citocinas inmunosupresoras, las antiinflamatorias interleucina 10 (IL-10) y el factor transformante del crecimiento beta (TGF- β) se encuentran entre las destacables que son producidas o inducidas por células tumorales. En concreto, elegir como objetivo a TGF- β ha aumentado sustancialmente la inmunidad antitumoral en modelos animales

(Seo *et al.*, 2001; Ogden *et al.*, 2005), sugiriendo que estrategias análogas en humanos deberían mostrar cierta eficacia clínica; la IL-10 es un mediador clave en la supresión inmunitaria que tiene lugar durante la infección patogénica e inmunosupresión por células tumorales, por ello también es tomada en cuenta para efectos antagonistas por parte de los aptámeros.

Otro componente a resaltar en este contexto, es el antígeno de Sialyl Lewis X (SLe^x) asociado a tumores, estrechamente relacionado con la tumorigénesis, la progresión y la metástasis (Belov, Zhou y Christopherson, 2010); interviniendo en la adhesión de células cancerosas a endotelios vasculares mediada por selectinas (Kannagi *et al.*, 2004). Su bloqueo impide la unión a su ligando, E-selectina, de modo que las células cancerosas no atraviesan la membrana basal de las células endoteliales vasculares, evitándose así la metástasis hematogénica del tumor (Shah *et al.*, 2009).

Tabla 4. Aptámeros en aplicación al diagnóstico y tratamiento del cáncer.

Aptámero	Descripción	Referencia
Aflibercept y pegaptanib	Agentes anti-VEGF para tratar la Degeneración macular, Retinopatía diabética y otras enfermedades maculares exudativas. Al no ser de origen murino, no conllevan respuestas alérgicas en contraste con los anticuerpos humanizados <i>Bevacizumab</i> y <i>Ranibizumab</i> .	Meredith, Schkade y Joondeph, (2017)
Aptámeros agonísticos para 4-1BB	Variedad bivalente que produce la multimerización del receptor <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> . Inducía una regresión significativa de tumores de mastocitoma P815 superior a la de los anticuerpos anti-4-1BB.	McNamara <i>et al.</i> (2008)
Aptámeros para OX40	Su administración sistemática evocaba un efecto remarcable en el tratamiento frente a tipos agresivos de melanoma. En otro caso, producían proliferación <i>in vitro</i> y aumentaban la producción de interferón gamma (IFN- γ) para linfocitos T activados, en comparación con estimulación por anticuerpos anti-CD28 y CD3.	Dollins <i>et al.</i> (2008) Practico, Sullenger y Nair, (2013)
E07	Ligando del receptor para el factor de crecimiento epidérmico (EGFR), sobreexpresado en carcinomas y tumores cerebrales. Obtuvo una mayor especificidad en la detección de células primarias humanas de Glioblastoma (GBM) con respecto al anticuerpo anti-EGFR (94.82% y 68.81% células tumorales respectivamente).	Wan, (2010)

SE15-8 HB5	Frente a ErbB2, un ligando sobreexpresado en cáncer de mama y otros tipos de tumores sólidos. Inhiben el crecimiento de células tumorales en cultivo y tumores en modelos murinos, un factor promotor a los anticuerpos actualmente utilizados.	Mahlknecht <i>et al.</i> (2013)
Aptámero anti-TIM-3 trimérico	Previene la unión a su ligando natural (Gal-9). En base molar es más efectivo que el anticuerpo frente a TIM-3. Induce inmunidad antitumoral.	Gefen <i>et al.</i> (2017)
aptCTLA-4	Frente al inhibidor CTLA-4 de los linfocitos T; registró un efecto antitumoral idéntico al anticuerpo monoclonal anti-CTLA-4 en ratón.	Huang <i>et al.</i> (2017)
Aptámeros anti-CD28	Potencian una respuesta inmune antitumoral en un modelo de linfoma murino. Es una alternativa prometedora con respecto al estudio clínico en fase I para anticuerpos TGN1412 agonistas de CD-28.	Pastor <i>et al.</i> (2013)
ARC81	Aptámero pegilado frente a TGF- β , inhibiendo su actividad <i>in vitro</i> . Su actividad farmacológica en el fluido ocular y otras áreas duró alrededor de 12h posterior a una sola administración.	McCauley <i>et al.</i> (2006)
Aptámeros para IL10R	Bloqueantes del receptor para la IL-10; inhibían el crecimiento del tumor CT26 tanto como los anticuerpos anti-IL-10R en ratón.	Berezhnoy <i>et al.</i> (2012)
Aptámeros para Sialyl Lewis X (SLex)	Inhibía la adhesión, y por tanto metástasis de las células HepG2 de carcinoma hepatocelular <i>in vitro</i> , siendo funcionalmente equivalente al anticuerpo monoclonal CSLEX-1.	Wang <i>et al.</i> (2017)

Investigación básica

El ELISA por ejemplo, utiliza anticuerpos y la reacción de cambio de color para identificar la presencia de sustancia; de otra forma, la versión de esta técnica con el empleo de aptámeros (ALISA) al estar biotinilados, producen un cambio de color por la unión a la enzima Peroxidasa conjugada con estreptavidina (Vivekananda y Kiel, 2006). Por otro lado, múltiples laboratorios han señalado que los resultados obtenidos en la transferencia de proteínas por el uso de aptámeros son comparables o incluso mejores que los obtenidos por el empleo de anticuerpos tradicionales (Lazzarotto *et al.*, 1997; Shin *et al.*, 2010). Otros incluyen ventajas accesorias; Shin *et al.* (2010) realizó un Western blot seguido de un corto período de incubación (2h en lugar de *overnight*) con el empleo de un aptámero en lugar del fármaco biológico (Shin *et al.*, 2010). De hecho, este laboratorio a su vez ha desarrollado tecnología biochip basada en aptámeros, específica para detección y cuantificación de proteínas (Lee y Hah, 2012).

Tabla 5. Aptámeros aplicables a metodologías de investigación básica.

Aptámero	Descripción	Referencia
ALISA	Equivalente al inmunoensayo ELISA con el empleo de aptámeros. Se observó ser superior al mismo en términos de eficiencia de detección para el antígeno bacteriano de la Tularemia causada por <i>Francisella tularensis</i> .	Vivekananda y Kiel, (2006)
APTEC	Ensayo de captura con una enzima asociada al aptámero. Al contrario que otros, no requiere de algunos reactivos (anticuerpos, nanopartículas, etc) o equipos de laboratorio para la confirmación de la enfermedad, tal que presenta un color intenso que se puede ver a simple vista para el resultado del diagnóstico.	Cheung <i>et al.</i> (2013)
IA-LC-MS	Espectrometría de Masas acoplada a Cromatografía Líquida basada en unión a Ligandos. Con concentraciones molares similares a los basados en anticuerpos, igualándolos e incluso superándolos en el rendimiento final de la prueba.	Gupta <i>et al.</i> (2016)

Biosensores

Según un estudio dirigido por la FDA, los aptámeros pueden ser usados para pruebas de control de calidad de proteínas terapéuticas, sensibles a pequeñas diferencias entre productos proteínicos que son indetectables por los anticuerpos monoclonales. Adicionalmente, *U.K's Department of Enviroment, Food, and Rural Affairs* (DEFRA) desarrolló aptámeros para la prueba de potencialidad de la Rabia, con el objetivo de reemplazar los ratones necesarios para la producción de anticuerpos, usados en preparaciones de vacunas (Department for Environment Food and Rural Affairs; Weidanz, 2014; Zichel *et al.*, 2012).

Desarrollo actual en la industria

Para analizar el número de estudios realizados hasta la fecha, se recurre a un análisis respecto al número de publicaciones anuales desde su primer descubrimiento hasta la actualidad, en donde los aptámeros mostrarían la tendencia presentada en la Fig 3.

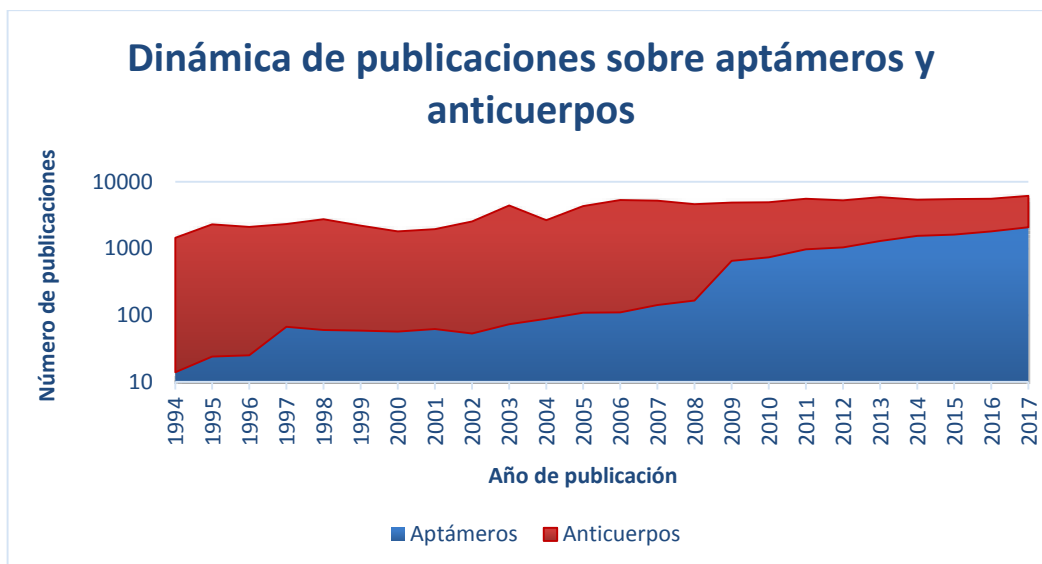


Fig 3. Publicaciones anuales de estudios sobre aptámeros y anticuerpos llevados a cabo desde el año 1994 hasta el año reciente, sin tener en cuenta el actual 2018. Los datos se extrajeron de la bases de bibliografía Science direct y Scopus.

Las publicaciones sobre anticuerpos desde el año 1994 siguen una tendencia constante y regular en el número de publicaciones por año; en cambio los aptámeros notablemente en minoría (en torno a 100 veces menor) desde el principio del periodo, siguen una dinámica muy variable, incrementándose el número de estudios a lo largo de los años, de forma más significativa en el período a partir del año 2008 e igualándose prácticamente a la mitad a estudios sobre anticuerpos en el año 2017. Con lo mencionado, podríamos concluir con que se están produciendo en la actualidad más estudios de desarrollo de aptámeros que los predecesores anticuerpos monoclonales en la industria biotecnológica.

Por otra parte a la perspectiva anterior, se procede a realizar un análisis ANOVA de un factor, en referencia al número total de publicaciones acumulativas respecto a ambos agentes terapéuticos (Fig 4).

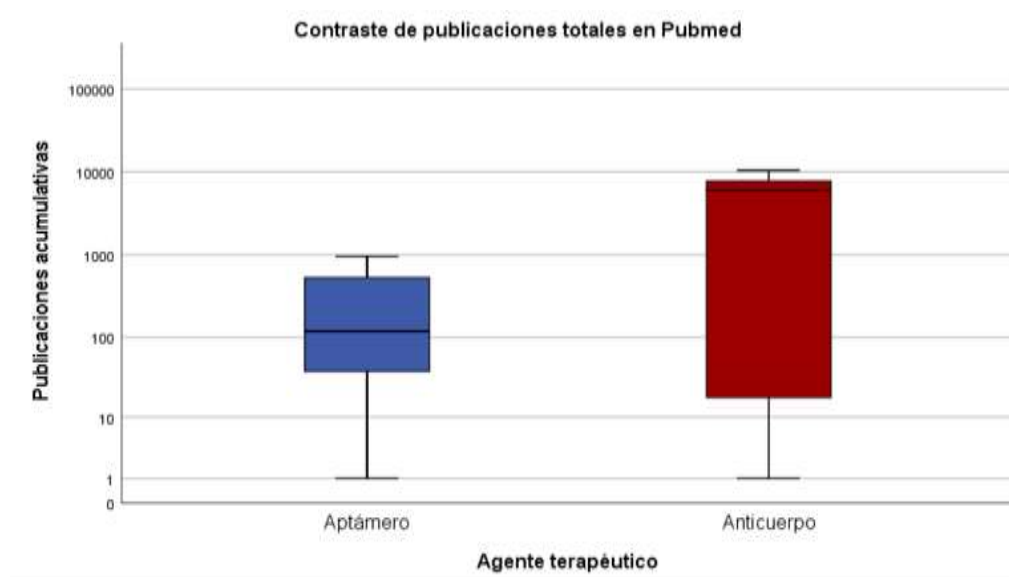


Fig 4. Boxplot para el número de publicaciones totales en Pubmed respecto a ambos agentes terapéuticos. Para la búsqueda en base de datos se utilizaron los términos “aptamer” y “monoclonal antibody”, de acuerdo a los filtros *Classical article* y *Journal Article*. Se obtuvo entre grupos para $gl= 1$, $F= 35,435$, $p\text{-valor}= 0,00$.

Tras obtener el resultado del contraste, un p-valor menor a 0,05 y por lo tanto no situado en el umbral de confianza, afirmamos que el número de publicaciones totales respecto a ambos términos no es semejante, según la prueba de homogeneidad de varianzas; por tanto aceptaremos la hipótesis alternativa suponiendo que hay una diferencia significativa entre ambos respecto a dicho factor, en lo que respecta más concretamente dentro del ámbito de la Biomedicina.

Los anticuerpos han mantenido una base relativamente sólida en clínica, no sólo debido a que se descubrieron antes, sino que no fueron tan protegidos desde sus comienzos por las patentes como lo han sido los aptámeros, o que esos mismos derechos se postergaron antes; y ello ha contribuido ampliamente a su consolidación en el sector biosanitario. En otro modo, los aptámeros fueron protegidos por patentes hasta muy recientemente (2008 en adelante; ello se ve reflejado en la Fig 3), lo que limitó ampliamente su distribución inicial. Es en ese momento cuando los anticuerpos se han establecido mejor en la industria médica (Fig 4), y por lo tanto se evita la aplicación de aptámeros por posibles riesgos al estar relativamente poco desarrollados en el aspecto práctico. El salto de los aptámeros desde la ciencia básica a las aplicaciones biotecnológicas no se produjo verdaderamente por primera vez hasta 2004, cuando la FDA aprobó el *Pegaptanib* como el primer aptámero de uso en terapia humana

(comercializado con el nombre de “Macugen”) para el tratamiento de la Degeneración macular asociada a la edad (Gragoudas et al., 2004). Desde entonces, son multitud de aptámeros los que se encuentran en proceso de investigación preclínica y clínica, en los distintos estadios que constituyen los ensayos. Algunos recopilados de la bibliografía figuran en el Apéndice Anexos, Tabla 2.

Discusiones

Existen ejemplos prometedores de aplicaciones basadas en anticuerpos que pueden ser potencialmente reemplazadas por aptámeros, algunos de los cuales se han descrito en el apartado de Resultados. Determinados aspectos que contribuirían a este hecho estarían relacionados con la producción y farmacodinamia que presentan los aptámeros en contraposición a los anticuerpos monoclonales.

Los aptámeros debido a su estabilidad, resisten rondas repetidas de desnaturalización/renaturalización manteniendo sus estructuras; a temperatura ambiente no necesitan refrigeración (Carlson, 2007), ofreciendo como resultado una prolongación de la vida útil de los productos que se basan en ellos. Por el contrario, debido a la naturaleza proteica que presentan los anticuerpos, son fácilmente degradables y requieren refrigeración para mantener su conformación, además de limitar su vida útil (Fosgerau y Hoffmann, 2015).

Otro aspecto a tener en cuenta es el tamaño. Los aptámeros al tratarse de moléculas pequeñas (12-30 KDa), su filtración renal es rápida (Ferreira *et al.*, 2009), confiriéndoles una vida media más corta; pero les capacita para unirse a dianas más pequeñas que los anticuerpos no pueden alcanzar (Lee *et al.*, 2010). Estos últimos resisten la filtración renal de acuerdo a su mayor tamaño (150-170 KDa para la IgG) (Sun *et al.*, 2014), lo que conlleva que presenten una vida media más larga respecto a los anteriores, un aspecto importante a tener en cuenta para fármacos de ámbito terapéutico.

Los aptámeros son fundamentalmente sintéticos y por lo tanto prescinde del uso de animales, evitando posibles abusos o muertes así como la necesidad de enviar protocolos de animales al Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales. Sin embargo, los anticuerpos son obtenidos *in vivo* mediante la estimulación de una respuesta inmunitaria en animales; quedando restringidos además a las condiciones del ambiente en el organismo animal y por tanto, ofrecen una menor amplitud frente a distintas aplicaciones en comparación a los aptámeros, cuya obtención es monitorizada en las condiciones de interés. Cabe añadir que en la producción de anticuerpos, estos sufren un proceso laborioso y costoso (Pardoll y Allison, 2004) respecto a la optimización y monitorización

de las variables que controlan las células en cultivos relativamente complejos, con el fin de mejorar los rendimientos y garantizar el mínimo coste posible en la producción a gran escala. Mientras, los aptámeros se basan en reacciones simples y precisas con poca o ninguna variación al automatizarse el proceso, lo que los hace más rentables al realizarse en menos tiempo (en torno a 1 y 3 meses) (Carlson, 2007). Esto último implica que apenas tienen riesgo de contaminación al contrario que los anticuerpos que poseen tiempos de desarrollo más largos (de 4 y 6 meses), además de que la comercialización o la publicación del estudio pueda suceder antes.

Los aptámeros no son reconocidos por el sistema inmunitario humano como extraños, y no producen consecutivamente una respuesta negativa en el organismo al contrario que muchos casos relacionados con anticuerpos, como *Bevacizumab* y *Ranibizumab* asociados a respuestas alérgicas (Meredith, Schkade y Joondeph, 2017). Con relación a este punto, los aptámeros se han definido como “aplicaciones ilimitadas” al ser capaces de reconocer moléculas no inmunógenas, como las toxinas (Parashar, Rajput y Sharma, 2015; Tang *et al.*, 2007); los anticuerpos debido a que están fuertemente vinculados al sistema inmunitario, su producción es defectuosa en este aspecto.

Respecto a la combinación con conjugados, los aptámeros los aceptan fácilmente al contrario que los anticuerpos, en donde puede conllevar la pérdida de su actividad (Stoltenburg, Reinemann y Strehlitz, 2007). Esta propiedad les ha atribuido un papel importante en investigación básica; se han conjugado con etiquetas proteicas, proteínas y nanopartículas para adquirir propiedades fluorescentes con el fin de detectar la concentración de moléculas, compuestos, virus, células alteradas, etc. Pero además, han demostrado tener una mayor especificidad y sensibilidad en lo que concierne al rendimiento del ensayo (Groff, Brown y Clippinger, 2015). También se han conjugado con nanomateriales para imágenes en la búsqueda de marcadores tumorales (Lao, Phua y Leong, 2015). Esta propiedad además ha permitido que sean agentes terapéuticos relevantes, donde alteran la actividad de la diana a la que van dirigidos. Se unen a receptores de superficie celular o participan en la entrega de fármacos a dianas celulares por conjugación con elementos como antibióticos, enzimas, o ARNs de interferencia (siRNA) (Groff, Brown y Clippinger, 2015); incluso si los mismos son impermeables a la célula porque pueden dirigirse frente a receptores internos a la superficie celular en determinadas circunstancias (Xiao *et al.*, 2008). En conjunto pues conllevan a mejorar la

eficacia del tratamiento y disminuir los efectos secundarios (Esposito, Catuogno y de Franciscis, 2014).

Por su pequeño tamaño, baja inmunogenicidad respecto a los anticuerpos, y rápida difusión y aclaramiento, los hace ideales para la generación de imágenes o *imaging*. Esto y su mayor flexibilidad, hace que constituyan una mejor alternativa en tratamiento a enfermedades infecciosas al ser capaces de penetrar en partículas virales; en un caso previno en torno a 10.000 veces la entrada y replicación del virus VIH en un cultivo de células humanas, por unión a la proteína vírica del VIH (Banerjee y Nilsen-Hamilton, 2013).

Todos los puntos señalados anteriormente han conducido al planteamiento de que los anticuerpos podrían tender a ser sustituidos por aptámeros, al presentar aspectos que podrían superar algunas debilidades asociadas a los mismos. Sin embargo, el desarrollo de aptámeros se ha visto limitado por algunos incidentes; uno de los más importantes la degradación por exo/ endonucleasas que sufren en suero al tratarse de ácidos nucleicos, afectando a su potencia terapéutica. Este factor constituye uno de los inconvenientes clave que han afectado al proceso de comercialización, y aun así actualmente varios aptámeros son sometidos a ensayos clínicos (ver Apéndice Anexos, Tabla 2).

En modo de ofrecer una mayor resistencia a dicha degradación, se han propuesto métodos como la incorporación de modificaciones químicas en los azúcares que constituyen los nucleótidos o en los enlaces fosfodiéster (Mirian *et al.*, 2017), basándose en la sensibilidad de estas enzimas por los nucleótidos naturales. Además, estos pueden ser reemplazados por nucleótidos sintéticos como el Xeno (XNA), que además de mejorar la resistencia a nucleasas aumentan la vida media su aplicación *in vivo* (Keefe, Pai y Ellington, 2010; Bruno, 2015).

Respecto a la filtración renal, al ser rápida es útil para las imágenes de diagnóstico *in vivo*, pero puede influir de forma negativa en otras aplicaciones biomédicas. Para este aspecto, entre las opciones encontramos la conjugación de aptámeros con polímeros de alto peso molecular como polietilenglicol (PEG), que no solo incrementan su vida media, sino que también mejoran la estabilidad y reducen la toxicidad por disminuir la acumulación del aptámero en órganos no diana (Lakhin, Tarantul y Gening, 2013). Precisamente para aptámeros terapéuticos, se han expresado componentes de conjugación como el PEG u otros de alto peso molecular, que podrían estimular la

producción de anticuerpos que neutralizarían a los aptámeros en el torrente sanguíneo y consecuentemente reducirían la toxicidad (Radom *et al.*, 2013; Sundaram *et al.*, 2013). Un estudio planteó esta vía de pegilación como una oportunidad además de desarrollo de nuevos aptámeros para administración sistemática, puesto que en el caso del Macugen solo se administraba subconjuntivamente (Bunka, Platonova y Stockley, 2010).

Como último factor, es de destacar que sus aplicaciones son limitadas por los derechos de propiedad intelectual. Tal y como se observa en la Fig 3, los estudios para desarrollo de aptámeros son cada vez más recurrentes en la industria biotecnológica, indicando que muy posiblemente en la actualidad se estén investigando más prototipos de aptámeros que de anticuerpos. Sin embargo, en el contraste clínico, son muy pocos los que se abarcan en pruebas preclínicas y ensayos clínicos, tal y como se observa en la Fig 4, en donde existe un claro predominio de anticuerpos monoclonales aplicados a Biomedicina, consolidados ya en el sector debido al mismo hecho de que no fueron protegidos por patentes tanto como lo han sido los aptámeros, o porque esos mismos derechos caducaron hace unos años. Todo ello pues, puede haber sido la causa de que uno de los campos en donde comenzaron a sobresalir sean las plataformas de biosensores o metodologías de investigación básica llevadas a cabo por las empresas biotecnológicas, y en donde más posiblemente estén siendo aplicados, dado que el procedimiento para publicaciones en este ámbito es relativamente más sencillo y rápido que en el biosanitario.

En relación a la terapia frente al cáncer, solo se conocía la quimioterapia y radioterapia como métodos efectivos para combatir a células tumorales, pero debido a la producción de efectos secundarios por su inespecificidad sobre células sanas, se ha recurrido a la búsqueda de nuevas formas de terapia. A este nivel, la inmunología ha destacado con la propuesta de tratamientos para ciertos tipos de cáncer o en combinación a los tradicionales; algunos consisten en la administración de ciertas citocinas, el bloqueo con anticuerpos de reguladores negativos de la función de células T (inhibidores del “checkpoint” inmunitario), terapias celulares diseñadas, y virus oncolíticos (Gotwals *et al.*, 2017). Los aptámeros constituirían otra alternativa a abordar, dada la especificidad que presentan frente a las dianas y que contribuiría a disminuir la toxicidad potencial que producen las terapias más comunes, además de que ofrecen por afinidad y caracterización un alto índice terapéutico; de hecho ambos aspectos son los principales en los que se están basando actualmente las terapias dirigidas al cáncer (Schrama, Reisfeld y Becker,

2006; Zhou y Rossi, 2014). Con el aumento del número de casos de cáncer en el mundo, es sabido que esta enfermedad es una de las más investigadas por su importancia médica. Los aptámeros están sobresaliendo en gran medida en esta especialidad biomédica dada la gran cantidad de estudios encontrados que se recogen en la Tabla 4. Más aún es de mencionar, que los anticuerpos ofrecen limitaciones en este aspecto, en lo que concierne a la poca penetración que presentan frente a tumores sólidos (Chames *et al.*, 2009; Jain y Stylianopoulos, 2010), además de su ya mencionada producción que conlleva costes relativamente más altos.

Con todo ello, las inmunoterapias más ampliamente descritas hasta ahora que han mostrado una respuesta clínica favorable frente a diversos tipos de tumores sólidos y neoplasias hematológicas, son los antagonistas CTLA-4, PD-1 y su mismo ligando PD-L1 (Ebert *et al.*, 2016); más conocidos como inhibidores de punto de control inmunitario (*Immune check-point inhibitors*). De acuerdo a este nivel, los aptámeros obtenidos en la Tabla 4, agonistas de receptores coestimuladores o bloqueantes de inhibidores, resultarían una tentativa prometedora para desarrollar en paralelo a los nuevos avances que se están llevando a cabo en terapia antitumoral.

Conclusiones

Existe una gran cantidad de literatura documentativa del éxito de las aplicaciones basadas en aptámeros, con respecto a reproductibilidad y eficacia semejante a aquellos estudios dominados por anticuerpos. Sin embargo, la aplicación comercial de aptámeros sigue relativamente sin evolucionar, mayoritariamente como se ha visto anteriormente, por la existencia de un vasto mercado basado en anticuerpos; aspecto más acentuado en la industria biomédica, debido a las regularidades más estrictas que conlleva así como que el procedimiento de publicar es más lento. A su vez, existe un cierto grado de incertidumbre para que los aptámeros sean abordados como productos aplicables; es crucial que ofrezcan mejoras realmente significativas respecto a las tecnologías actuales, para ser considerados aptos e introducirse en ensayos clínicos para aplicación biosanitaria. En los últimos años, se han realizado avances para optimizar las distintas variedades del *SELEX*, y por tanto muchas de sus limitaciones han sido superadas; nuevos métodos como el *hybrid-SELEX* y sistemas de entrega de fármacos son introducidos para superar algunas de las limitaciones de su aplicación *in vivo*. Si bien los aptámeros no sustituirían en su totalidad a los anticuerpos a largo plazo, también pueden aplicarse en terapias combinadas como los otros, e incluso encontrar sus propios campos de actuación;

tal y como se ha visto en este estudio con respecto a desarrollos en terapia antitumoral, predominantemente en el campo de la Inmuno-oncología. Precisamente por el escenario de presencia de reguladores positivos y negativos en esta especialidad, los aptámeros son relevantes debido a su posible modificación para presentar doble funcionalidad: doble antagonista o integrador agonista-antagonista; mejorando el control de los efectos secundarios de gran importancia en la inmunoterapia frente al cáncer. Es probable que en un futuro próximo la tecnología de los aptámeros encuentre cada vez más uso en el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos y de diagnóstico en Biomedicina.

Conclusions

There is a large amount of documentary literature about aptamer-based applications' success, concerning repeatability and efficacy similar to those dominated by antibodies. However, the commercial application of aptamers remains relatively without evolve, mostly as it was seen before, by the existence of a vast market based on antibodies; more emphasized aspect in biomedical industry, due to the tighter regularities that implies as well as that the publication process is slower. Likewise, there is a certain grade of uncertainty for considering aptamers as suitable products; it is crucial that they really offer meaningful improvements regarding current technologies, in order to be accounted fit and enter clinical trials for biosanitary application. In recent years, advances have been carried out to optimize the different varieties of *SELEX*, and therefore lots of its limitations have been overcome; new methods like *hybrid-SELEX* and drug delivery systems are brought in to overcome some of the limitations from their *in vivo* application. Although aptamers will not fully replace antibodies in the long term, they also can be applied to combined therapies as the other ones, even find their own field of activity; as in this study regarding them as an option on developments of antitumor therapy, mainly in the field of Inmuno-oncology. Accurately, positive and negative regulators' presence in this specialiy makes aptamers relevant, due to their free modification to portray double functionality: double antagonist or agonist-antagonist integrator; that involves a better control of side effects, so important in immunotherapy against cancer. It is likely that aptamer technology has an increased use in the near future on the development of new therapeutic and diagnostic agents in Biomedicine.

Bibliografía

- Amraee, M., Oloomi, M., Yavari, A. and Bouzari, S. (2017) "DNA aptamer identification and characterization for E. coli O157 detection using cell based SELEX method", *Analytical biochemistry*, 536, pp. 36-44.
- Acevedo, B. *et al.* (2002) "Development and validation of a quantitative ELISA for the measurement of PSA concentration", *Clinica Chimica Acta*, 317 (1-2), pp. 55-63.
- Albrecht, S., Brandl, H., Steinke, M. and Freidt, T. (1994) "Chemiluminescent enzyme immunoassay of prostate-specific antigen based on indoxyl phosphate substrate", *Clinical chemistry*, 40, pp. 1970-1.
- Banerjee, J. and Nilsen-Hamilton, M. (2013) "Aptamers: multifunctional molecules for biomedical research", *J.Mol.Med*, 91 (12), pp. 1333-1342.
- Belov, L., Zhou, J. and Christopherson, R.I. (2010) "Cell surface markers in colorectal cancer prognosis", *Int J Mol Sci*, 12 (1), pp. 78-113.
- Berezhnoy, A. *et al.* (2012) "Isolation and optimization of murine IL-10 receptor blocking oligonucleotide aptamers using high-throughput sequencing", *Mol. Ther*, 20 (6), pp. 1242-1250.
- Bunka, D.H., Platonova, O. and Stockley, P.G. (2010) "Development of aptamer therapeutics", *Curr. Opin. Pharmacol*, 10, pp. 557-562.
- Bruno, J. (2015) "Predicting the Uncertain Future of Aptamer-Based Diagnostics and Therapeutics", *Molecules*, 20, pp. 6866-6887.
- Bouvier-Müller, A. and Ducongé, F. (2018) "Nucleic acid aptamers for neurodegenerative diseases", *Biochimie*, 145, pp. 73-83.
- Burke, D.H. and Willis, J.H. (1998) "Recombination, RNA evolution, and bifunctional RNA molecules isolated through chimeric SELEX", *RNA*, 4 (9), pp. 1165-1175.
- Coulter, L.R., Landree, M.A. and Cooper, T.A. (1997) "Identification of a new class of exonic splicing enhancers by in vivo selection", *Mol. Cell. Biol*, 17 (4), pp. 2143-2150.
- Camorani, S., Crescenzi, E., Fedele, M. and Cerchia, L. (2018) "Oligonucleotide aptamers against tyrosine kinase receptors: Prospect for anticancer applications", *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*.
- Cruz-Toledo, J. *et al.* (2012) "Aptamer base: A collaborative knowledge base to describe aptamers and SELEX experiments", *Database*, 2012.
- Carlson, B. (2007) "Aptamers: The New Frontier In Drug Development?", *Biotechnol Healthc*, 4 (2), pp. 31.
- Chang, Y.M., J. Donovan, M. and Tan, W. (2013) "Using Aptamers for Cancer Biomarker Discovery", *Journal of nucleic acids*, 2013.
- Cheung, Y. W., Kwok, J., Law, A. W., Watt, R. M., Kotaka, M. and Tanner, J. A. (2013) "Structural basis for discriminatory recognition of Plasmodium lactate dehydrogenase by a DNA aptamer", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110 (40), pp. 15967-15972.
- Chang, C.C., Wei, S.C., Wu, T.H., Lee, C.H. and Lin, C.W. (2013) "Aptamer-based colorimetric detection of platelet-derived growth factor using unmodified gold nanoparticles", *Biosens Bioelectron*, 42, pp. 119-123.

Chames, P., van Regenmortel, M., Weiss, E. and Baty, D. (2009) “Therapeutic antibodies: Successes, limitations and hopes for the future”, *Br. J. Pharmacol*, 157, pp. 220–233.

Dollins, C.M. *et al.* (2008) “Assembling OX40 aptamers on a molecular scaffold to create a receptor-activating aptamer”, *Chem. Biol*, 15 (7), pp. 675–682.

Department for Environment Food and Rural Affairs (2015) Development of aptamer-based technology to detect residues of veterinary drugs, and constituents of vaccines — VM02162. Disponible en: <http://randd.defra.gov.uk/Default.aspx?Menu=Menu&Module=More&Location=None&Completed=2&ProjectID=16304> (Acceso 10 de marzo 2018).

Driessens, G., Kline, J. and Gajewski, T.F. (2009) “Costimulatory and coinhibitory receptors in anti-tumor immunity”, *Immuno*, 229 (1), pp. 126–144.

Esposito, C.L., Catuogno, S. and de Franciscis, V. (2014) “Aptamer-mediated selective delivery of short RNA therapeutics in cancer cells”, *Journal of RNAi and gene silencing: an international journal of RNA and gene targeting research*, 10, pp. 500–506.

European Union Drug Regulating Authorities Clinical Trials. (2004). EudraCT.

Ellington, A.D. and Szostak, J.W. (1990) “In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands”, *Nature*, 346, pp. 818–822.

Ellington, A.D. and Szostak, J.W. (1992) “Selection in vitro of single-stranded DNA molecules that fold into specific ligand-binding structures”, *Nature*, 355 (6363), pp. 850.

Ebert, P. J. *et al.* (2016) “MAP kinase inhibition promotes T cell and anti-tumor activity in combination with PD-L1 checkpoint blockade”, *Immunity*, 44 (3), pp. 609–621.

Famulok, M. and Mayer, G. (2014) "Perspective: Aptamers and SELEX in Chemistry & Biology", *Chemistry and Biology*, 21, pp. 1055–1058.

Famulok, M., Mayer, G. and Blind, M. (2000) “Nucleic acid aptamers - From selection in vitro to applications in vivo”, *Accounts of Chemical Research*, 33 (9), pp. 591–599.

Famulok, M., Blind, M. and Mayer, G. (2001) “Intramers as promising new tools in functional proteomics”, *Chemistry & biology*, 8 (10), pp. 931-939.

Feng, S., Chen, C., Wang, W. and Que, L. (2018) “An aptamer nanopore-enabled microsensor for detection of theophylline”, *Biosensors and Bioelectronics*.

Ferreira, C. S., Cheung, M. C., Missailidis, S., Bisland, S. and Gariepy, J. (2009) “Phototoxic aptamers selectively enter and kill epithelial cancer cells”, *Nucleic Acids Res*, 37, pp. 866–876.

Fosgerau, K. and Hoffmann, T. (2015) “Peptide therapeutics: current status and future directions”, *Drug Discov Today*, 20, pp. 122-128.

Gefen, T., Castro, I., Muharemagic, D., Puplampu-Dove, Y., Patel, S. and Gilboa, E. (2017) “A TIM-3 Oligonucleotide Aptamer Enhances T Cell Functions and Potentiates Tumor Immunity in Mice”, *Molecular Therapy*, 25 (10), pp. 2280-2288.

Gene Link™ (n.d.) *SELEX* protocol. [Internet]. Disponible en: <http://www.genelink.com/newsite/products/aptamers.asp> [Acceso 18 de abril 2018].

Gragoudas, E.S., Adamis, A.P., Cunningham, E.T. Jr, Feinsod, M. and Guyer, D.R. (2004) “Pegaptanib for neovascular age-related macular degeneration”, *N Engl J Med*, 351 (27), pp. 2805-16.

Gotwals, P. *et al.* (2017) “Prospects for combining targeted and conventional cancer therapy with

immunotherapy” *Nature Reviews Cancer*, 17 (5), pp.286.

Graves, H. C., Wehner, N. and Stamey, T. A. (1992) “Ultrasensitive radioimmunoassay of prostate-specific antigen”, *Clinical chemistry*, 38, pp. 735–42.

Groff, K., Brown, J. and Clippinger, A. J. (2015) “Modern affinity reagents : Recombinant antibodies and aptamers”, *Biotechnology Advances*, 33 (8), pp. 1787-1798.

Gugerli, M.E. and Ramel, M.E. (2004) “Production of monoclonal antibodies for the serological identification and reliable detection of Apple stem pitting and Pear yellow vein viruses in apple and pear”, *Acta Hortic*, 657, pp. 59–69.

Guo, P. (2010) “The emerging field of RNA nanotechnology”, *Nat. Nanotechnol*, 5, pp. 833–842.

Gupta, V., Lassman, M. E., McAvoy, T., Lee, A. Y., Chappell, D. L. and Laterza, O. F. (2016) “An evaluation of an aptamer for use as an affinity reagent with MS: PCSK9 as an example protein”, *Bioanalysis*, 8 (15), pp. 1557-1564.

Green, L.S. *et al.* (1995) “Nuclease-Resistant Nucleic-Acid Ligands to Vascular-Permeability Factor Vascular Endothelial Growth-Factor”, *Chem Biol*, 2 (10), pp. 683–695.

Germer, K., Leonard, M. and Zhang, X. (2013) “RNA aptamers and their therapeutic and diagnostic applications”, *Int J Biochem Mol Biol*, 4 (1), pp. 27–40.

Graziani, A. C. *et al.* (2017) “High efficiency binding aptamers for a wide range of bacterial sepsis agents”, *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27 (4), pp. 838–843.

Hermann, T. and Patel, D.J. (2000) “Adaptive recognition by nucleic acid aptamers”, *Science*, 287, pp. 820–825.

Hirao, I., Kimoto, M. and Lee, K. H. (2018) “DNA aptamer generation by ExSELEX using genetic alphabet expansion with a mini-hairpin DNA stabilization method”, *Biochimie*, 145, pp. 15–21.

Homann, M. and Goring, H.U. (1999) “Combinatorial selection of high affinity RNA ligands to live African trypanosomes”, *Nucleic Acids Res*, 27 (9), pp. 2006-2014.

Herr, J., Smith, J., Medley, C., Shangguan, D. and Tan, W. (2006) “Aptamer-conjugated nanoparticles for selective collection and detection of cancer cells”, *Anal. Chem*, 78 (9), pp. 2918–2924.

Huang, C.J., Lin, H.I., Shiesh, S.C. and Lee, G.B. (2010) “Integrated microfluidic system for rapid screening of CRP aptamers utilizing systematic evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX)”, *Biosens. Bioelectron*, 25 (7), pp. 1761–1766.

Huang, B. *et al.* (2017) ‘A CTLA-4 Antagonizing DNA Aptamer with Antitumor Effect’, *Molecular Therapy: Nucleic Acid*, 8, pp. 520–528.

Jolly, P. *et al.* (2016) “Aptamer–MIP hybrid receptor for highly sensitive electrochemical detection of prostate specific antigen”, *Biosensors and Bioelectronics*, 75, pp. 188–195.

Jenison, R.D., Gill, S.C., Pardi, A. and Polisky, B. (1994) “High-resolution molecular discrimination by RNA”, *Science*, 263 (5152), pp. 1425–1429.

Jiang, Y. *et al.* (2017) “Aptamer/AuNP biosensor for colorimetric profiling of exosomal proteins”, *Angewandte Chemie International Edition*, 56 (39), pp. 11916-11920.

Jain, R.K. and Stylianopoulos, T. (2010) “Delivering nanomedicine to solid tumors”, *Nat. Rev. Clin. Oncol*, 7, pp. 653–664.

- Keefe, A.D., Pai, S. and Ellington, A. (2010) "Aptamers as therapeutics", *Nat. Rev. Drug Discov*, 9, pp. 537–550.
- Kannagi, R., Izawa, M., Koike, T., Miyazaki, K. and Kimura, N. (2004) "Carbohydrate-mediated cell adhesion in cancer metastasis and angiogenesis", *Cancer science*, 95 (5), pp. 377–384.
- Kotia, R.B., Li, L. and McGown, L.B. (2000) "Separation of nontarget compounds by DNA aptamers", *Anal. Chem*, 72, pp. 827–831.
- Khati, M., Schuman, M., Ibrahim, J., Sattentau, Q., Gordon, S. and James, W. (2003) "Neutralization of infectivity of diverse R5 clinical isolates of human immunodeficiency virus type 1 by gp120-binding 2'F-RNA aptamers", *J. Virol*, 77 (23), pp. 692–12,698.
- Khedri, M. *et al.* (2015) "International Immunopharmacology Cancer immunotherapy via nucleic acid aptamers", *International Immunopharmacology*.
- Komorowska, B., Hasiów-jaroszewska, B. and Minicka, J. (2017) "Application of nucleic acid aptamers for detection of Apple stem pitting virus isolates", *Molecular and Cellular Probes*, 36, pp. 62–65.
- Kratschmer, C. and Levy, M. (2018) "Targeted Delivery of Auristatin-Modified Toxins to Pancreatic Cancer Using Aptamers", *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, 10, pp. 227–236.
- Liu, G. *et al.* (2009) "Aptamer - Nanoparticle Strip Biosensor for Sensitive Detection of Cancer Cells", *Analytical chemistry*, 81 (24), pp. 10013–10018.
- Li, F., Du, Z., Yang, L. and Tang, B. (2013) "Selective and sensitive turn-on detection of adenosine triphosphate and thrombin based on bifunctional fluorescent oligonucleotide probe", *Biosensors and Bioelectronics*, 41, pp. 907–910.
- Li, J., Tan, S., Chen, X., Zhang, C.Y. and Zhang, Y. (2011) "Peptide aptamers with biological and therapeutic applications", *Curr. Med. Chem*, 18, pp. 4215–4222.
- Lu, Y. and Liu, J. (2013). *Aptamer-based colorimetric sensor systems*. US 8,470,532 B2.
- Lakhin, A.V., Tarantul, V.Z. and Gening, L.V. (2013) "Aptamers: problems, solutions and prospects", *Acta Nat*, 5, pp. 34–43.
- Lao, Y.H., Phua, K.K. and Leong, K.W. (2015) "Aptamer nanomedicine for cancer therapeutics: barriers and potential for translation", *ACS Nano*, 9, pp. 2235–2254.
- Lazarotto, T., Maine, G.T., Dal Monte, P., Ripalti, A. and Landini, M.P. (1997) "A novel Western blot test containing both viral and recombinant proteins for anticytomegalovirus immunoglobulin M detection", *J. Clin. Microbiol*, 35, pp. 393–397.
- Lee, G.H. and Hah, S.S. (2012) "Coomassie blue is sufficient for specific protein detection of aptamer-conjugated chips", *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 22 (4), pp. 1520–1522.
- Li, H. *et al.* (2011) "Electrochemical immunosensors for cancer biomarker with signal amplification based on ferrocene functionalized iron oxide nanoparticles", *Biosensors and Bioelectronics*, 26 (8), pp. 3590–3595.
- Lato, S.M., Boles, A.R. and Ellington, A.D. (1995) "In vitro selection of RNA lectins: using combinatorial chemistry to interpret ribozyme evolution", *Chem. Biol*, 2, pp. 291–303.
- Lee, J.H., Yigit, M.V., Mazumdar, D. y Lu, Y. (2010) "Molecular diagnostic and drug delivery agents based on aptamer-nanomaterial conjugates", *Adv Drug Deliv Rev*, 62 (6), pp. 592–605.

Mahlknecht, G., Maron, R., Mancini, M., Schechter, B., Sela, M. and Yarden, Y. (2013) "Aptamer to ErbB- 2/HER2 enhances degradation of the target and inhibits tumorigenic growth", *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110, pp. 8170-8175.

Müller, J. *et al.* (2011) "Profiling of active thrombin in human blood by supramolecular complexes", *Angewandte Chemie International Edition*, 50 (27), pp. 6075-6078.

Müller, J. *et al.* (2012) "Monitoring of plasma levels of activated protein C using a clinically applicable oligonucleotide-based enzyme capture assay", *J. Thromb. Haemost*, 10 (3), pp. 390-398.

Mukhopadhyay, R. (2005) "Aptamers are ready for the spotlight", *Anal. Chem*, 77, pp. 114A–118A.

Martin, J. A., Phillips, J. A., Parekh, P., Sefah, K. and Tan, W. (2011) *Mol. BioSyst*, 7 (5), pp. 1720–1727.

McNamara, J.O. *et al.* (2006) "Cell type-specific delivery of siRNAs with aptamer-siRNA chimeras", *Nat Biotechnol*, 24 (8), pp. 1005.

McNamara, J.O. *et al.* (2008) "Multivalent 4-1BB binding aptamers costimulate CD8+T cells and inhibit tumor growth in mice", *J. Clin. Invest*, 118 (1), pp. 376–386.

May, K.F., Chen, L., Zheng, P. and Liu, Y. (2002) "Anti-4-1BB monoclonal antibody enhances rejection of large tumor burden by promoting survival but not clonal expansion of tumor-specific CD8+T cells", *Cancer Res*, 62, pp. 3459–3465.

McCauley, T.G. *et al.* (2006) "Pharmacologic and pharmacokinetic assessment of anti-TGFβ2 aptamers in rabbit plasma and aqueous humor", *Pharm. Res*, 23 (2), pp. 303–311.

Melero, I. *et al.* (1997) "Monoclonal antibodies against the 4-1BB T-cell activation molecule eradicate established tumors", *Nat. Med*, 3 (6), pp. 682–685.

Meredith, G.G., Schkade, P.A. and Joondeph, B.C. (2017) "ALLERGIC REACTION UPON INTRAVITREAL ADMINISTRATION OF ANTI – VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR AGENTS", *Retinal Cases & Brief Reports*.

Mescalchin, A. and Restle, T. (2011) "Oligomeric nucleic acids as antivirals", *Molecules*, 16 (2), pp. 1271-96.

Mirian, M., Khanahmad, H., Darzi, L., Salehi, M. and Sadeghi-Aliabadi, H. (2017) "Oligonucleotide aptamers: potential novel molecules against viral hepatitis", *Res Pharm Sci*, 12(2), pp. 88–98.

Ni, X., Castanares, M., Mukherjee, A. and Lupold, S.E. (2011) "Nucleic acid aptamers: clinical applications and promising new horizons", *Curr. Med. Chem*, 18, pp. 4206–4214.

Nastasijevic, B., Wright, B.R., Smestad, J., Warrington, A.E., Rodriguez, M. and Maher, L.J. (2012) "Remyelination induced by a DNA aptamer in a mouse model of multiple sclerosis", *PLoS One*, 7 (6), e39595.

Nitsche, A. *et al.* (2007) "One-step selection of vaccinia virus-binding DNA aptamers by MonoLEX", *BMC Biotechnol*, 7 (1), pp. 48.

Ouellet, E., Foley, J.H., Conway, E.M. and Haynes, C. (2015) "Hi-Fi SELEX: a high-fidelity digital-PCR based therapeutic aptamer discovery platform", *Biotechnol. Bioeng*, 112 (8), pp. 1506–1522.

Ogden, C.A. *et al.* (2005) "Enhanced apoptotic cell clearance capacity and B cell survival factor production by IL-10-activated macrophages: implications for Burkitt's lymphoma", *J. Immunol*, 174 (5), pp. 3015–3023.

- Patel, D.J. (1997a) "Structural analysis of nucleic acid aptamers", *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 1, pp. 32–46.
- Patel, D.J. *et al.* (1997b) "Structure, recognition and adaptive binding in RNA aptamer complexes", *J. Mol. Biol.*, 272, pp. 645–664.
- Poolsup, S. and Kim, C. Y. (2017) "Therapeutic applications of synthetic nucleic acid aptamers", *Current Opinion in Biotechnology*, 48, pp. 180–186.
- Parashar, A., Rajput, Y.S. and Sharma, R. (2015) "Aptamer-Based Sensing of b-Casomorphin-7", *J Agric Food Chem*, 63, pp. 2647–53.
- Pardoll, D. and Allison, J. (2004) "Cancer immunotherapy: breaking the barriers to harvest the crop", *Nature medicine*, 10, pp. 887–892.
- Pastor, F. (2016) "Tumor-targeted costimulation by using bi-specific aptamers", *Cancer Cell Microenviron*, 3.
- Pastor, F. *et al.* (2013) "CD28 aptamers as powerful immune response modulators", *Mol. Ther–Nucleic Acids*, 2.
- Pei, X., Zhang, J. and Liu, J. (2014) "Clinical applications of nucleic acid aptamers in cancer", *Mol. Clin. Oncol*, 2, pp. 341–348.
- Pratico, E.D., Sullenger, B.A. and Nair, S.K. (2013) "Identification and characterization of an agonistic aptamer against the T cell costimulatory receptor, OX40", *Nucleic Acid Ther*, 23, pp. 35–43.
- Qi, Y. and Li, B. (2011) "A Sensitive, Label- Free, Aptamer- Based Biosensor Using a Gold Nanoparticle- Initiated Chemiluminescence System", *Chem. Eur. J*, 17 (5), pp. 1642–1648.
- Radom, F., Jurek, P.M., Mazurek, M.P., Otlewski, J. and Jelen, F. (2013) "Aptamers: molecules of great potential", *Biotechnol. Adv*, 31, pp. 1260–1274.
- Reinemann, C. and Strehlitz, B. (2014) "Aptamer-modified nanoparticles and their use in cancer diagnostics and treatment", *Swiss Med Wkly*, 144 (1), w13908.
- Rhodes, A. *et al.* (2000) "The generation and characterization of antagonist RNA aptamers to human oncostatin M", *J Biol Chem*, 275 (37), pp. 28555–61.
- Rimmele, M. (2003) "Nucleic acid aptamers as tools and drugs: recent developments", *Chembiochemistry*, 4, pp. 963–971.
- Stoltenburg, R., Reinemann, C. and Strehlitz, B. (2007) "SELEX-A (r)evolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands", *Biomolecular Engineering*, 24 (4), pp. 381–403.
- Sekiya, S., Noda, K., Nishikawa, F., Yokoyama, T., Kumar, P.K.R. and Nishikawa, S. (2006) "Characterization and application of a novel RNA aptamer against the mouse prion protein", *J. Biochem*, 139, pp. 383–390.
- Schrama, D., Reisfeld, R.A. and Becker, J.C. (2006) "Antibody targeted drugs as cancer therapeutics", *Nat. Rev. Drug Discov*, 5, pp. 147–159.
- Schlecht, U., Gronewold, T. M. A., Malave, A. and Tewes, M. (2007) "Detection of receptor-ligand interactions with an GHz impedance biosensor system", *IEEE Sensors Journal*, 7 (12), pp. 1680–1684.
- Seo, N., Hayakawa, S., Takigawa, M. and Tokura, Y. (2001) "Interleukin-10 expressed at early tumour sites induces subsequent generation of CD4+T-regulatory cells and systemic collapse of antitumour immunity", *Immunology*, 103, pp. 449–457.

Sett, A., Borthakur, B. B., Sharma, J. D., Kataki, A. C. and Bora, U. (2017) "DNA aptamer probes for detection of estrogen receptor α positive carcinomas", *Translational Research*, 183, pp. 104-120.

Shah, M. H., Sainger, R. N., Telang, S. D., Pancholi, G. H., Shukla, S. N. and Patel, P. S. (2009) "E-Cadherin truncation and sialyl Lewis-X overexpression in oral squamous cell carcinoma and oral precancerous conditions", *Neoplasma*, 56 (1), pp. 40-47.

Speiser, D.E., Utzschneider, D.T., Oberle, S.G., Münz, C., Romero, P. and Zehn, D. (2014) "T cell differentiation in chronic infection and cancer: functional adaptation or exhaustion?", *Nat. Rev. Immunol.*, 14, pp. 768–774.

Shin, S., Kim, I.H., Kang, W., Yang, J.K. y Hah, S.S. (2010) "An alternative to Western blot analysis using RNA aptamer-functionalized quantum dots", *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 20 (11), pp. 3322–3325.

Sundaram, P., Kurniawan, H., Byrne, M.E. y Wower, J. (2013) "Therapeutic RNA aptamers in clinical trials", *Eur. J. Pharm. Sci.*, 48, pp. 259–271.

Sun, H., Zhu, X., Lu, P. Y., Rosato, R. R., Tan, W. and Zu, Y. (2014) "Oligonucleotide aptamers: new tools for targeted cancer therapy", *Molecular Therapy-Nucleic Acids*, 3.

Suntharalingam, G. *et al.* (2006) "Cytokine storm in a phase 1 trial of the anti-CD28 monoclonal antibody TGN1412", *N. Engl. J. Med.*, 355 (10), pp. 1018–1028.

Stecker, J.R., Savage, A.A., Bruno, J.G., García, D.M. and Koke, J.R. (2012) "Dynamics and visualization of MCF7 adenocarcinoma cell death by aptamer-C1q-mediated membrane attack", *Nucleic Acid Ther.*, 22, pp. 275–282.

Tuerk, C. and Gold, L. (1990) "Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase", *Science*, 249, pp. 505–510.

Takenaka, M., Okumura, Y., Amino, T., Miyachi, Y., Ogino, C. and Kondo, A. (2017) "DNA-duplex linker for AFM-SELEX of DNA aptamer against human serum albumin", *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 27 (4), pp. 954–957.

Takahashi, M., Saito, H., Higashimoto, M., Atsukawa, K. and Ishii, H. (2005) "Benefit of hepatitis C virus core antigen assay in prediction of therapeutic response to interferon and ribavirin combination therapy", *J. Clin. Microbiol.*, 43, pp. 186–191.

Takahashi, M. (2018) "Aptamers targeting cell surface proteins", *Biochimie*, 145, pp. 63–72.

Tang, J., Yu, T., Guo, L., Xie, J., Shao, N. and He, Z. (2007) "In vitro selection of DNA aptamer against abrin toxin and aptamer-based abrin direct detection", *Biosens Bioelectron.*, 22 (11), pp. 2456–63.

Tombelli, S., Minunni, M., Luzi, E. and Mascini, M. (2005) "Aptamer-based biosensors for the detection of HIV-1 Tat protein", *Bioelectrochemistry*, 67 (2), pp. 135–41.

Tucker, C.E., Chen, L.S., Judkins, M.B., Farmer, J.A., Gill, S.C. and Drolet, D.W. (1999) "Detection and plasma pharmacokinetics of an anti-vascular endothelial growth factor oligonucleotide-aptamer (NX1838) in rhesus monkeys", *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.*, 732, pp. 203–212.

Ulrich, H. *et al.* (2006) "DNA and RNA aptamers: from tools for basic research towards therapeutic applications", *Comb. Chem. High Throughput Screen.*, 9 (8), pp. 619–632.

US National Institutes of Health. (2012). ClinicalTrials.gov.

Vivekananda, J. and Kiel, J.L. (2006) "Anti-Francisella tularensis DNA aptamers detect tularemia

- antigen from different subspecies by aptamer-linked immobilized sorbent assay”, *Lab Invest*, 86 (6), pp. 610–618.
- Wachter, A., Tunc-Ozdemir, M., Grove, B. C., Green, P. J., Shintani, D. K. and Breaker, R. R. (2007) “Riboswitch control of gene expression in plants by splicing and alternative 3' end processing of mRNAs”, *Plant Cell*, 19 (11), pp. 3437–50.
- Wang, J. *et al.* (2014) “Particle display: a quantitative screening method for generating high-affinity aptamers”, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl*, 53 (19), pp. 4796–4801.
- Wilson, D.S. and Szostak, J.W. (1999) “In vitro selection of functional nucleic acids”, *Annu. Rev. Biochem*, 68, pp. 611–647.
- Wan, Y. (2010) “Surface- immobilized aptamers for cancer cell isolation and microscopic cytology”, *Cancer Res*, 70, pp. 9371–9380.
- Wandtke, T., Wozniak, J. and Kopinski, P. (2015) “Aptamers in diagnostics and treatment of viral infections”, *Viruses*, 7, pp. 751–780.
- Wang, L. *et al.* (2017) “QCM-based aptamer selection and detection of *Salmonella typhimurium*”, *Food Chemistry*, 221, pp. 776–782.
- Weber, J. (2007) “Review: anti-CTLA-4 antibody ipilimumab: case studies of clinical response and immune-related adverse events”, *Oncologist*, 12, pp. 864–872.
- Wheeler, L.A. *et al.* (2013) “Durable knockdown and protection from HIV transmission in humanized mice treated with gel-formulated CD4 aptamer-siRNA chimeras”, *Mol. Ther*, 21 (7), pp. 1378–1389.
- Wherry, E.J. *et al.* (2007) “Molecular signature of CD8+ T cell exhaustion during chronic viral infection”, *Immunity*, 27 (4), pp. 670–684.
- Woo, S.R. *et al.* (2012) “Immune inhibitory molecules LAG-3 and PD-1 synergistically regulate T-cell function to promote tumoral immune escape”, *Cancer Res*, 72 (4), pp. 917–927.
- Weidanz, J. (2014) *Methods of Assaying Vaccine Potency*. US20140141455A1.
- Xi, Z. *et al.* (2015) “Selection of HBsAg-Specific DNA Aptamers Based on Carboxylated Magnetic Nanoparticles and Their Application in the Rapid and Simple Detection of Hepatitis B Virus Infection”, *ACS Appl Mater Interfaces*, 7 (21), pp. 11215–23.
- Xiao, Z., Shangguan, D., Cao, Z., Fang, X. and Tan, W. (2008) “Cell-specific internalization study of an aptamer from whole cell selection”, *Chemistry*, 14, pp. 1769–1775.
- Yu-Lin, D. U., Liu-Ting, M. O., Ya-Sha, Y. I., Li-Ping, Q. I. U. and Wei-Hong, T. A. N. (2017) “Aptamers from Cell-based Selection for Bioanalysis and Bioimaging”, *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 45 (12), pp. 1757–1765.
- Zümrit, H. E., Batool, S., Van, N., George, S., Bhandari, S. and Mallikaratchy, P. (2017) “Structural optimization of an aptamer generated from Ligand-Guided Selection (LIGS) resulted in high affinity variant toward mIgM expressed on Burkitt’s lymphoma cell lines”, *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1861 (7), pp. 1825–1832.
- Zangar, R. C., Daly, D. S. and White, A. M. (2006) “ELISA microarray technology as a high-throughput system for cancer biomarker validation”, *Expert Review of Proteomics*, 3, pp. 37–44.
- Zhao, N., Pei, S. N., Parekh, P., Salazar, E. and Zu, Y. (2014) “Blocking interaction of viral gp120 and CD4-expressing T cells by single-stranded DNA aptamers”, *Int J Biochem Cell Biol*, 51, pp. 10–8.

Zhao, L. *et al.* (2016) “Enhanced and differential capture of circulating tumor cells from lung cancer patients by microfluidic assays using aptamer cocktail”, *Small*, 12 (8), pp. 1072–1081.

Zhou, J. and Rossi, J. (2014) “Cell-type-specific, aptamer-functionalized agents for targeted disease therapy”, *Mol. Ther. Nucleic Acids*, 3.

Zhou J. and Rossi, J. (2017) “Aptamers as targeted therapeutics: current potential and challenges”, *Nat Rev Drug Discov*, 16 (3), pp. 181-202.

Zichel, R., Chearwae, W., Pandey, G.S., Golding, B. and Sauna, Z.E. (2012) “Aptamers as a sensitive tool to detect subtle modifications in therapeutic proteins”, *PLoS One*, 7 (2), e31948.

Anexos

Tabla 1. Aptámeros para taupatías (Bouvier-Müller y Ducongé, 2018, p.77).

Aptámero	Diana	Kd	Uso	Referencia
SsDNA1	Tau ₃₈₁	190±10 nM	Detección	
Tau 1	Oligómeros humanos	tau ₄₀	Inhibidor	
USP ₁₄₋₁	Sistema Proteasoma de Ubiquitina (UPS)	ND	Degradación de Tau	
USP ₁₄₋₂				
USP ₁₄₋₃				

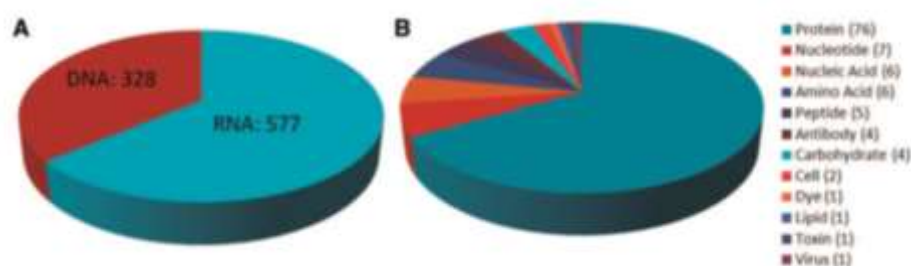


Fig 1. Sumatorio de los tipos de dianas y aptámeros encontrados en la “Aptamer Base”. En A) distribución de en torno a 900 tipos de aptámeros descritos en la misma base. En B) distribución de 131 dianas para aptámeros encontradas en la base de datos (Cruz-Toledo *et al.*, 2012, p.5).

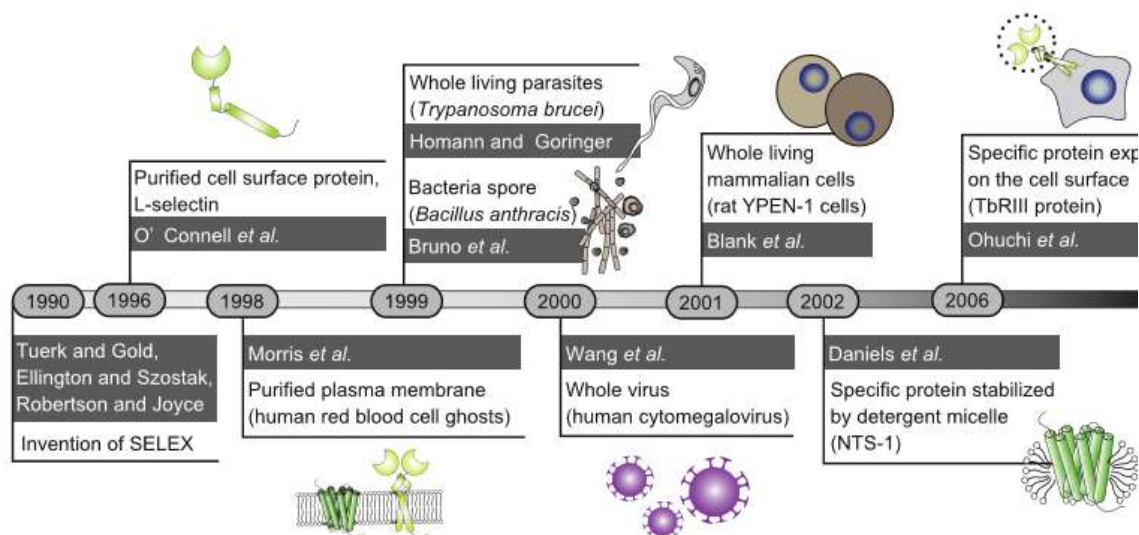


Fig 2. Desarrollo de métodos representativos de SELEX para proteínas de superficie celular (Takahashi, 2018, p.65).

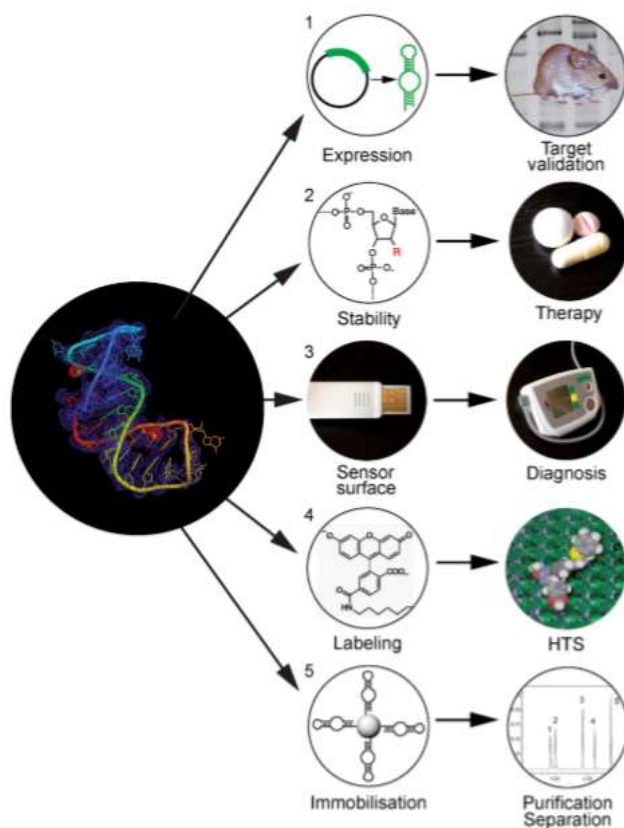


Fig 3. Aplicaciones de aptámeros. Su carácter sintético permite su expresión *in vivo* en células (1), estabilización por modificación química (2), sensores para diagnóstico (3), asociación a sondas y moléculas de anclaje (4), o inmovilización en matrices o “carriers” (5). Consecutivamente, sus campos de acción se extienden desde validación de dianas, terapia y diagnóstico hasta el *screening* de alto rendimiento (HTS) y purificaciones (Famulok y Mayer, 2014, p.1056).

Tabla 2. Estudios de desarrollo de aptámeros en distintas fases de ensayos clínicos. Datos extraídos de las bases ClinicalTrials.gov y EudraCT.

Estudio	Aptámero/s	Condición médica	Responsables
<u>A Study of ARC1905 (Anti-C5 Aptamer) in Subjects With Dry Age-related Macular Degeneration</u>	ARC1905	<ul style="list-style-type: none"> Degeneración macular asociada a la edad 	Ophthotech New York
<u>A Study to Establish the Safety and Tolerability of Zimura® (Anti-C5 Aptamer) in Combination With Anti-VEGF Therapy in Subjects With Idiopathic Polypoidal Choroidal Vasculopathy (PCV)</u>	Zimura	<ul style="list-style-type: none"> Vasculopatía coroidea polipoidea idiopática 	Pheonix, Arizona, EE.UU
<u>A Safety and Efficacy Study of E10030 (Anti-PDGF Pegylated Aptamer) Plus Lucentis for Neovascular Age-Related Macular Degeneration</u>	E10030 más Lucentis	<ul style="list-style-type: none"> Degeneración macular asociada a la edad 	Palmetto Retinal Center West Columbia, South Carolina
<u>ARC1905 (ANTI-C5 APTAMER) Given Either In Combination Therapy With Lucentis® 0.5 mg/Eye In Subjects With Neovascular Age-Related Macular Degeneration</u>	ARC1905	<ul style="list-style-type: none"> Degeneración macular asociada a la edad 	Ophthotech Corp New York
<u>A Phase 1, Safety, Tolerability and Pharmacokinetic Profile of Intravitreal Injections of E10030 (Anti-PDGF Pegylated Aptamer) in Subjects With Neovascular Age-Related Macular Degeneration</u>	E10030	<ul style="list-style-type: none"> Degeneración macular asociada a la edad 	Denise Teuber New York
<u>Phase II/III Study of Anti-VEGF in Neovascular AMD</u>	EYE001 anti-VEGF	<ul style="list-style-type: none"> Degeneración macular Neurovascularización coroidal. 	Foundation for Fighting Blindness Baltimore, Maryland
<u>Molecular biosensors for detection of bladder cancer</u>		<ul style="list-style-type: none"> Neoplasias de Vejiga urinaria 	University of California Irvine, Orange
<u>The Clinical Application of 68Ga Labeled ssDNA Aptamer Sgc8 in Healthy Volunteers and Colorectal Patients</u>	68Ga-Sgc8	<ul style="list-style-type: none"> Cáncer Colorrectal 	- Xijing Hospital Nuclear Medicine Department, Xi'an.

<u>An 18 Month Phase 2a Open Label, Randomized Study of Avastin®, Lucentis®, or Eylea® (Anti-VEGF Therapy) Administered in Combination With Fovista® (Anti-PDGF BB Pegylated Aptamer)</u>	Fovista® Bevacizumab Ranibizumab Aflibercept	<ul style="list-style-type: none"> Degeneración macular asociada a la edad 	<ul style="list-style-type: none"> Phoenix, Arizona Beverly Hills Sacramento y 21 más
<u>Safety and Dosing Evaluation of REG1 Anticoagulation System</u>	REG1	<ul style="list-style-type: none"> Salud 	National Heart, Lung and Blood Institute (NHLBI), Bethesda
<u>Zimura in Subjects With Geographic Atrophy Secondary to Dry Age-Related Macular Degeneration</u>	Zimura Sham	<ul style="list-style-type: none"> Atrofia Geográfica Degeneración macular 	<ul style="list-style-type: none"> Phoenix, Arizona Tucson, Arizona y 56 más
<u>EYE001 to Treat Retinal Tumors in Patients With Von Hippel-Lindau Syndrome</u>	EYE001	<ul style="list-style-type: none"> Enfermedad de Hippel-Lindau 	National Eye Institute (NEI), Bethesda
<u>A Phase 3 Safety and Efficacy Study of Fovista® (E10030) Intravitreal Administration in Combination With Lucentis® Compared to Lucentis® Monotherapy</u>	E10030 Ranibizumab Inyección intravítrea simulada de E10030	<ul style="list-style-type: none"> Degeneración macular asociada a la edad 	<ul style="list-style-type: none"> Phoenix, Arizona Bakersfield Beverly Hills y 112 más.
<u>A Phase 3 Safety and Efficacy Study of Fovista® (E10030) Intravitreal Administration in Combination With Lucentis® Compared to Lucentis® Monotherapy</u>	E10030 Ranibizumab Inyección intravítrea simulada de E10030	<ul style="list-style-type: none"> Degeneración macular asociada a la edad 	<ul style="list-style-type: none"> Tucson, Arizona Fresno, California y 118 más

<u>A Phase 3 Safety and Efficacy Study of Fovista® (E10030) Intravitreal Administration in Combination With Either Avastin® or Eylea® Compared to Avastin® or Eylea® Monotherapy</u>	E10030 Bevacizumab o Aflibercept Inyección intravítrea simulada de E10030	<ul style="list-style-type: none"> Degeneración macular asociada a la edad 	<ul style="list-style-type: none"> - Gilbert, Arizona - Phoenix, Arizona - Tucson, Arizona y 204 más
<u>Study of the Safety, Tolerability and Pharmacokinetics of 1 Mg/Eye and 3 Mg/Eye Pegaptanib Sodium in Patients With Exudative Age-Related Macular Degeneration (AMD)</u>	Pegaptanib sodium (Macugen)	<ul style="list-style-type: none"> Degeneración macular asociada a la edad 	
<u>A Clinical Trial to Explore Safety and Efficacy of Different Doses of Pegaptanib Sodium, Compared to Sham, in Patients With Wet AMD.</u>	Pegaptanib sodium	<ul style="list-style-type: none"> Degeneración macular asociada a la edad 	
<u>A Clinical Trial to Explore the Safety and Efficacy of Three Different Doses of Pegaptanib Sodium in Patients With Wet Age-Related Macular Degeneration (AMD)</u>	Pegaptanib sodium	<ul style="list-style-type: none"> Degeneración macular 	Charlotte Eye, Ear, Nose and Throat Associates, P.A, Charlotte.
<u>Pegaptanib Sodium Compared to Sham Injection in Patients With DME Involving the Center of the Macula</u>	Pegaptanib sodium (Macugen)	<ul style="list-style-type: none"> Edema macular diabético 	
<u>Atrial Fibrillation Research In CATalonia</u>		<ul style="list-style-type: none"> Arritmia auricular Fibrilación auricular Hipertensión Diabetes Mellitus 	
<u>An Open-Label Investigator Sponsored Trial to Investigate the Safety, Tolerability and Development of Subfoveal Fibrosis By Intravitreal Administration of Altering Regimens of Fovista and Anti-VEGF Therapy in Subjects With Neovascular Age-Related Macular Degeneration</u>	Fovista™ Lucentis® Avastin® Eylea®	<ul style="list-style-type: none"> Degeneración Macular Neovascular relacionada con la Edad 	Retinal Consultants of Arizona

<u>A Study of the Pharmacokinetics, Pharmacodynamics, and Safety of ARC1779 Injection in Patients With Von Willebrand Disease Type 2B</u>	ARC1779	<ul style="list-style-type: none"> Enfermedad de Von Willebrand 	
<u>ARC1779 Injection in Patients With Von Willebrand Factor-Related Platelet Function Disorders</u>	ARC1779	<ul style="list-style-type: none"> Púrpura, trombótica trombocitopénica Enfermedad de Von Willebrand tipo 2b. 	Archemix Investigational Site Vienna, Austria
<u>IST Neoadjuvant Abraxane in Newly Diagnosed Breast Cancer</u>	Nab-Paclitaxel	<ul style="list-style-type: none"> Cáncer de mama 	<ul style="list-style-type: none"> Bankstown Lidcome Hospital Royal North Shore Hospital, Sydney Barwon Health, Geelong y 2 más.
<u>Lexaptetid Pegol (NOX-H94) in ESA-hyporesponsive Anemia in Dialysis Patients</u>	Lexaptetid pegol (NOX-H94) y placebo	<ul style="list-style-type: none"> Anemia Enfermedad Renal en Etapa Terminal 	<ul style="list-style-type: none"> Dialysis Unit, Düsseldorf University Hospital of Halle Hospital of Leipzig y 7 más
<u>Bevacizumab Versus Ranibizumab for Diabetic Retinopathy</u>	Bevacizumab Ranibizumab	<ul style="list-style-type: none"> Retinopatía diabética Edema macular diabético Retinopatía diabética Proliferativa 	Department of Ophthalmology, Medical University of Vienna
<u>NOX-E36 First-in-Human (FIH) Study</u>	NOX-E36 y placebo	<ul style="list-style-type: none"> Enfermedades inflamatorias crónicas Diabetes Mellitus tipo 2 Lupus Eritematoso Sistémico 	
<u>NOX-A12 First-in-human (FIH) Study</u>	NOX-A12	<ul style="list-style-type: none"> Transplante autólogo de células madre 	Scope Life Sciences GmbH, Germany

<u>A Single-Center Trial of High Frequency Pegaptanib for Rapid Restoration of VEGF Levels in Diabetic Retinal Edema</u>	Macugen (Pegaptanib Sodium)	• Edema macular diabético	Retina Institute of Hawaii, EE.UU
<u>A Single-Center Trial of Intravitreal Injections of Macugen (Pegaptanib Sodium) Given at Least 7 Days Before Vitrectomy Secondary To Tractional Retinal Detachment in Proliferative Diabetic Retinopathy</u>	Macugen (Pegaptanib Sodium)	• Retinopatía diabética proliferativa (PDR).	Retina Institute of Hawaii, EE.UU
<u>First-in-Human and Proof-of-Mechanism Study of ARC19499 Administered to Hemophilia Patients</u>	ARC19499 y control placebo	• Hemofilia	London, U.K.
<u>NOX-A12 Multiple Ascending Dose Study in Healthy Volunteers</u>	NOX-A12 Filgrastim NOX-A12 en combinación con Filgrastim	• Transplante de células madre hematopoyéticas	Charité Research Organisation GmbH, Germany
<u>A Study of AS1411 Combined With Cytarabine in the Treatment of Patients With Primary Refractory or Relapsed Acute Myeloid Leukemia</u>	AS1411 y Citarabina	• Leucemia Mieloide Aguda	- UCLA, Los Ángeles - Weill Medical College of Cornell University - Medical University of South Carolina y 11 más
<u>An open-label investigator sponsored trial to investigate the safety, tolerability and development of subfoveal fibrosis by intravitreal administration of altering regimens of FovistaTM (Anti-PDGF)...</u>	E10030-02	• Degeneración macular neurovascular relacionada con la edad	Barcelona Macula Foundation Research for Vision

<u>A Phase 2/3 Randomized, Double-Masked, Controlled Trial to Assess the Safety and Efficacy of Intravitreal Administration of Zimura® (Anti-C5 Aptamer) in Subjects with Geographic Atrophy Secondary...</u>	OPH2003	<ul style="list-style-type: none"> Atrofia geográfica secundaria a la Degeneración Macular relacionada con la edad 	OPHTHOTECH CORPORATION
<u>Subretinal Macugen for neovascular age-related macular degeneration (SUMANA)</u>	AU-06102G	<ul style="list-style-type: none"> Degeneración macular neurovascular (exudativa) relacionada con la edad 	Society (Institute) for clinical research
<u>A phase 2b randomized, double-masked, controlled trial to establish the safety and efficacy of intravitreal administration of Fovista® (Anti-PDGFBB pegylated aptamer) administered...</u>	OPH1007	<ul style="list-style-type: none"> Degeneración macular neovascular asociada a la edad subfoveal (DMAE) 	OPHTHOTECH CORPORATION
<u>A phase 3 randomized, double-masked, controlled trial to establish the safety and efficacy of intravitreal administration of Fovista™ (Anti PDGF-B pegylated aptamer) administered...</u>	OPH1004	<ul style="list-style-type: none"> Degeneración macular neovascular asociada a la edad subfoveal 	OPHTHOTECH CORPORATION
<u>A Phase II Open-label, Multicenter Extension Study to Assess the Long-term Safety and Efficacy of Vamorolone in Boys with Duchenne Muscular Dystrophy (DMD)</u>	VBP-003	<ul style="list-style-type: none"> Distrofia muscular de Duchenne (DMD) 	ReveraGen BioPharma Inc.
<u>A 24-month Phase II Open-label, Multicenter Long-term Extension Study to Assess the Long-term Safety and Efficacy of Vamorolone in Boys with Duchenne Muscular Dystrophy (DMD)</u>	VBP15-LTES	<ul style="list-style-type: none"> Distrofia muscular de Duchenne (DMD) 	ReveraGen BioPharma Inc.
<u>A phase 3 randomized, double-masked, controlled trial to establish the safety and efficacy of intravitreal administration of Fovista™ (anti PDGF-b pegylated aptamer) administered...</u>	OPH1003	<ul style="list-style-type: none"> Neovascularización coroidea subfoveal secundaria a la Degeneración macular relacionada con la edad (DMAE). 	OPHTHOTECH CORPORATION
<u>A phase 3 randomized, double-masked, controlled trial to establish the safety and efficacy of intravitreal administration of Fovista™ ...</u>	OPH1002A	<ul style="list-style-type: none"> Neovascularización coroidea subfoveal secundaria a la Degeneración macular relacionada con la edad (DMAE). 	OPHTHOTECH CORPORATION

<u>A phase 2, randomized, double-masked, controlled trial to establish the safety and efficacy of intravitreal injections of e10030 (anti-pdgf pegylated aptamer) given in combination with lucentis®...</u>	OPH1001A	<ul style="list-style-type: none"> Neovascularización coroidea subfoveal secundaria a la Degeneración macular relacionada con la edad (DMAE). 	OPHTHOTECH CORPORATION
<u>An Exploratory randomized, double-masked, multi-center, multi-dose comparative trial, in parallel groups, to explore the safety and efficacy of three different doses of intravitreal injections...</u>	EOP1014	<ul style="list-style-type: none"> Degeneración macular asociada con la edad. 	OSI Eyetech, Inc